

TOXIZITÄT VON ATG

WINFRIED HUBER

1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Universitätskinderklinik der
Universität München (Direktor Prof.
Dr. med. H.-B. Hadorn)
Abteilung für Haematologie und Onko-
logie (Leiter Prof. Dr. med. R.J. Haas)

TOXIZITÄT VON ATG

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Winfried Huber

aus

Bad Tölz

Jahr

1983

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. R. J. Haas
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. G. Riethmüller
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	12. 6. 1986

Herrn Prof. Dr. med. R. J. Haas, Leiter der Abteilung
für Hämatologie und Onkologie der Universitäts-Kinder-
Klinik München, danke ich für die Überlassung des
Themas und die Förderung der Arbeit.

Meinem Lehrmeister und väterlichen Freund
Dr. Oskar Schwarzmayer gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG

2. MÖGLICHKEITEN ZUR TOXIZITÄTSPRÜFUNG VERSCHIEDENER CHARGEN VON ATG IN VITRO

2.1. Methoden

2.2. Ergebnisse

2.3. Beurteilung

3. KLINISCHE TOXIZITÄT NACH ANWENDUNG VON ATG IN VIVO

3.1. Einleitung: Das Krankheitsbild der SAA

3.1.1. Definition der AA

3.1.2. Klinisches Bild

3.1.3. Ursachen

3.1.4. Definition der SAA

3.1.5. Prognose der SAA

3.1.6. Blackfan Diamond AA

3.2. Klinische Toxizitätsprüfung

3.2.1. Patienten, Untersuchungen

3.2.2. Ergebnisse

4. DISKUSSION

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1970 und 1972 berichteten Mathé und andere (23,29) daß eine Vorbehandlung mit Anti-Lymphozyten-Globulin (ALG) bei Knochenmarkstransplantationen haploidentischer Spender einen heilenden Effekt bei ungefähr einem Drittel der Patienten mit aplastischer Anämie hatte.

Nachdem R. B. Epstein in Villejuif Mathés Fälle überprüft hatte, und im August 1970 in München das XIII. Treffen der "International Society of Hämatology" stattgefunden hatte, wurden zwei Dinge offensichtlich (42):

- a) Es war unwahrscheinlich, daß in allen Fällen spontane Remissionen verantwortlich waren.
- b) Bei keinem der Patienten mit Remission konnte nachgewiesen werden, daß das transplantierte Knochenmark komplett anwuchs.

In dem vierten Report der EBMTG (European Bone Marrow Transplantation Group) Arbeitssitzung über SAA (Severe Aplastic Anemia - siehe 3.1.) wurden alle Patienten, die vom Januar 1981 bis zum Dezember 1982 mit immunsuppressiver Therapie oder mit Knochenmarkstransplantation behandelt wurden, verglichen (12). 24 europäische Zentren berichteten über 234 Patienten, wovon 89 mit immunsuppressiver Therapie und 145 mit Knochenmarkstransplantation behandelt wurden.

Für die Studie ausgeschlossen wurden:

1. Patienten, die zuvor mit immunsuppressiver Therapie und anschließend eine Knochenmarkstransplantation erhielten.
2. Patienten, die einen eineiigen Zwilling als Spender oder einen nicht kompatiblen Spender hatten.

Ergebnisse der Knochenmarkstransplantationen:

65 % der Patienten hatten eine Überlebensrate von einem Jahr.

Ergebnisse der immunsuppressiven Therapie:

69 % der Patienten hatten eine Überlebensrate von einem Jahr.

Vergleich: 65 % aller Patienten mit SAA starben in den ersten 6 Monaten nach Diagnosestellung, wenn sie nicht behandelt wurden (38).

Es wurde kein Unterschied erkennbar zwischen den folgenden verschiedenen Arten von Immunsuppressiva.

- Therapie:
1. ATG allein oder zusammen mit haplo-identischer Knochenmarksinfusion (3 Patienten)
 2. ATG zusammen mit hohen Dosen 6-Methyl-Prednisolon (17 Patienten) oder
 3. 6-Methyl-Prednisolon alleine (15 Patienten)

Diese Studie verdeutlicht den Wert der immunsuppressiven Therapie in der Behandlung von SAA, wenn kein HLA-identischer Knochenmarkspender vorhanden ist oder ein anderer Grund (z. B. Weigerung des Spenders) gegen eine Knochenmarkstransplantation vorliegt.

Die optimale Therapie der SAA muß so lange unklar bleiben wie die Pathophysiologie dieser Erkrankung unbekannt ist. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden die folgenden verschiedenen Pathomechanismen diskutiert (siehe auch 3.1.3.):

Der Erfolg der Knochenmarkstransplantation unterstützt nachhaltig die Theorie eines direkten Stammzellschadens. Auf der anderen Seite läßt der erfolgreiche ATG Gebrauch auch andere Mechanismen wahrscheinlich erscheinen. Dies stimmt auch mit der Beobachtung von Remissionen nach anderen immunsuppressiven Therapien (mit 6-Methyl-Prednisolon oder Cyclophosphamid z. B.) überein (10).

In einer randomisierten kontrollierten Studie von Champlin e. a. wurde kürzlich der Nutzen von ATG in der Behandlung von SAA (siehe 3.1.4.) untersucht. Innerhalb von 3 Monaten nach der Therapie wiesen 11 von 21 Patienten, die nach dem Zufallsgesetz ATG erhielten, eine Verbesserung des Blutbildes auf. Bei den 21 Patienten, die lediglich symptomatisch behandelt wurden, kam es zu keinerlei Änderung. 6 von 12 Kontrollpatienten, die anschließend ATG erhielten, zeigten wiederum ein Ansprechen. Bei den auf die Behandlung ansprechenden Patienten kam es zu allmählichen Teilremissionen der Hämpoese, aber keiner der Patienten erreichte völlig normale periphere Blutwerte. Auch diese Daten zeigen an, daß ATG die Hämpoese bei manchen Patienten mit AA günstig beeinflussen kann (9).

Es ist noch nicht erwiesen, ob ATG direkt in Zellmembran von hämpoetischen Vorläuferzellen beeinflußt und diese damit für humorale Aktivatoren empfänglicher macht, oder ob ATG über die Inaktivierung von sogenannten Suppressor-T-Lymphozyten wirkt. Zumindest bei einigen Patienten konnte ein Anstieg der CFU-C (siehe 2.1.) beobachtet werden, nachdem diese Suppressor-T-Lymphozyten mit Rosettentechniken oder ATG-Behandlung entfernt wurden (31). Trotz der guten Erfolge mit ATG ist jedoch der klinische Einsatz behindert, da erhebliche Kreuzreaktionen mit normalen hämpoetischen Zellen auftreten können. Dies führt zu Thrombozytopenie, Granulozytopenie und Anämie. Auch hämpoetische Stammzellen können geschädigt werden (31). Auf jeden Fall können

mit ATG jedoch die noch viel gravierenden Nebenwirkungen der konventionellen immunsuppressiven Therapie mit Endoxan oder Prednison z. B., die je einen sehr unspezifischen Wirkungsmechanismus hat, umgangen werden.

Besonders deutlich erkennen kann man die unerwünschten Nebenwirkungen von ATG bei in vitro Untersuchungen von nicht absorbiertem ATG. ATG bzw. ALG hat nämlich beispielsweise nicht nur auf rosettenbildende T-Lymphozyten hemmende Wirkung, sondern auch auf hämopoetische Stammzellen (Messung der hämopoetischen Stammzellen mit der CFU-C Technik = Colony forming units in culture, siehe 2.1.). Dies zeigt indirekt, daß nicht absorbiertes ATG oder ALG Antikörper gegen eine Reihe von Antigen-determinanten enthält, wobei andere als T-Zell-spezifische Antikörper für die Inaktivierung der hämopoetischen Vorläuferzellen verantwortlich sind. Um kreuzreagierende Antikörper gegen hämopoetische Vorläuferzellen zu eliminieren, wurde ATG mit verschiedenen menschlichen Zellsuspensionen absorbiert. Die Ergebnisse von B. Netzel zeigen, daß die Absorption mit Leber-Niere-Homogenat nur einen Teil der Kreuzaktivität gegen granulopoetische Vorläuferzellen entfernt. Die zusätzliche Absorption der Antiseren mit gepoolten B-Zellen von chronisch lymphatischer Leukämie oder zusätzlich mit einem Pool von B-lymphoblastoiden Zelllinien ermöglichte ein Kolonienwachstum vergleichbar mit Kontrollen ohne Antiserum. Es wurde dann keinerlei Toxizität gegen CFU-C mehr beobachtet. Nach Inkubation mit niedrigen Verdünnungsstufen war eine Stimulation der Kolonienbildung erkennbar (Abb. 1) (31).

Auch die Untersuchung, ob absorbiertes und nicht absorbiertes ATG hämopoetische Vorläuferzellen, die in vitro in die erythrozytäre Reihe ausdifferenzieren,

beeinflußt (siehe Abb. 2 in 2.1.), ergibt, daß nach Inkubation mit nicht absorbiertem ATG und Komplement das Kolonienwachstum vollständig unterdrückt wird, während absorbiertes ATG keine Hemmung des Kolonienwachstums im CFU-C oder CFU-E Test bewirkt (siehe Abb. 2 in 2.1.). Die Toxizität von ATG, von dem im Teil 2 dieser Arbeit 15 Chargen ausgetestet wurden, und die daraus resultierende klinische Anwendung, die im Teil 3 dieser Arbeit am Beispiel von 10 mit ATG behandelten Kindern untersucht wurden, ergibt sich also in erster Linie aus dem Grad der Reinigung des ATG. Möglicherweise läßt sich dieses Problem in Zukunft durch die Verwendung von monoklonalen Antisera, die ja sehr spezifisch Antikörper enthalten, lösen.

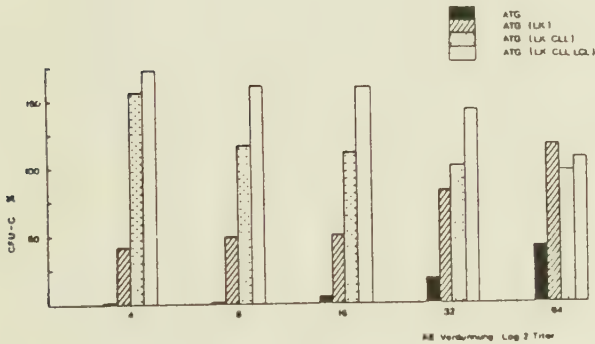


Abb. 1: Toxizität von unterschiedlich absorbiertem anti-T Zell Globulin (ATG) gegen hämopoetische Stammzellen (31)

2. MOGLICHKEITEN ZUR TOXIZITÄTSPRÜFUNG VERSCHIEDENER CHARGEN VON ATG IN VITRO

2.1. Methoden

Die in der Einleitung schon angesprochene CFU-C Technik (Colony forming units in culture) hat sich als geeignetes Indikatorsystem zum Nachweis hamopoetischer Stammzellen erwiesen. Die hamopoetischen Stammzellen selbst sind nämlich nicht morphologisch erkennbar. Durch diesen in vitro Test, der die Proliferation von myelopoetisch determinierten Stammzellen ermöglicht, kann man Erkenntnisse über die Quantität und die Qualität von hamopoetischen Stammzellen im Knochenmark und im peripheren Blut gewinnen. Myeloisch determinierte Stammzellen können durch die Fähigkeit, in einer semisoliden Agarkultur zu Kolonien von reifen Granulozyten und Makrophagen auszuwachsen, nachgewiesen werden. Die Proliferation und Ausdifferenzierung dieser CFU-C erfordert das Vorhandensein eines spezifischen Glykoproteins, dem sogenannten Colony stimulating factor (CSF). Pike und Robinson (1970) adaptierten diese Technik für das Wachstum humaner Stammzellen. Der Colony stimulating factor wird hierbei in einer sogenannten "feeder layer" Schicht, bestehend aus peripheren Leukozyten, gebildet. Seiner Eigenschaft nach ist der Colony stimulating factor ein Glykoprotein, Molekulargewicht 45.000, mit elektrophoretischer Beweglichkeit in der Alpha Globulin/post Albumin Region, hitzelabil über 60°C, resistent gegenüber RNase, DNase sowie Neuraminidase. Wirksame Aktivität bei 10^{-11} bis 10^{-12} Mol. Die Konzentration im menschlichen Serum beträgt 1ng/ml. Der CSF wird in dem beschriebenen Testsystem vorwiegend von Monozyten sezerniert, jedoch ist eine optimale Menge von Granulozyten in der Zellsuspension erforderlich, welche mit ca. 35 % bestimmt wurde.

Wie aus Abb. 2 ersichtlich ist, gehören die Colony forming unit cells (CFU-C) zu einer Population, die noch nicht ausdifferenziert, aber schon determiniert für die myelo-monozytäre Reihe ist. Sie sind morphologisch noch nicht erkennbar. Unter den gegebenen Kulturbedingungen im halbfesten Agar beginnen die determinierten Stammzellen jedoch zu proliferieren, wodurch ausdifferenzierte Zellen verschiedener Reifungsgrade entstehen. Beim CFU-C Test handelt es sich um Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen. Die neu gebildeten Zellen sind in Kolonien angeordnet. Das bedeutet, daß man von der nach 12 - 14 Tagen gebildeten Anzahl an Kolonien auf die Anzahl der in Kultur gebrachten Stammzellen schließen kann.

Technik: 1 ml einer Mischung aus modifiziertem McCoy Medium, 15 % eines selektierten foetalen Kälberserums, Natriumpyruvat, MEM Vitamine, MEM Aminosäuren, MEM nicht essentielle Aminosäuren, Glutamin, L-Serin und L-Asparagin, weiterhin 0,5 % Agar und 10^6 Leukozyten, bestehend aus mononuklearen Zellen des peripheren Blutes mit 35 % Granulozyten, wurden als "feeder layer" auf den Boden einer Petrischale (35 mm Durchmesser) ausgegossen (33). Die "feeder layer" können bis zum Gebrauch als CSF Quelle etwa 1 Woche bei 37°C in einem CO_2 Inkubator mit 100 % Luftfeuchtigkeit aufgehoben werden. Dann wurden 10^5 oder 2×10^5 der zu untersuchenden Knochenmarkszellen in der angegebenen Lösung aus modifiziertem McCoy Medium (36), 15 % foetalem Kälberserum und 0,3 %igem Agar suspensiert und auf den "feeder layer" pipettiert. Das Mischen der Knochenmarkszellen mit dem Agar erfolgte bei 37°C jeweils in einem Wasserbad. Nach Erstarren der Agarsuspension bei Raumtemperatur wurden die Kulturschalen für 12 - 14 Tage bei 37°C in einer Atmosphäre mit 100 % Luftfeuchtigkeit und in einem kontinuierlichen Strom

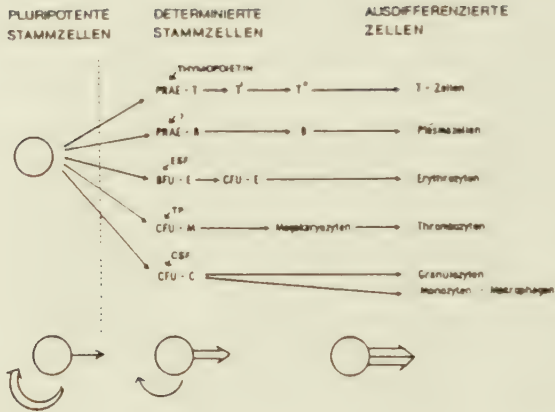


Abb. 2 Die Stellung der CFU-C im hämopoetischen System (1).

Abkürzungen:

- BFU-E Erythropoetisch determinierte Stammzelle
- CFU-E " " "
- CFU-M Vorläuferzelle der Megakaryozyten
- CFU-C Myeloisch determinierte Stammzelle
- ESF Erythropoetin
- TP Thrombopoetin
- CSF Kolonienstimulierender Faktor

von 5 % CO_2 kultiviert. Die nach dieser Zeit entstandenen Kolonien (CFU-C) wurden in einem umgekehrten Mikroskop (Leitz-Diavert) gezählt, wobei eine Kolonie definiert ist als eine Einheit von mindestens 50 Zellen. Die Präparation der Zellsuspension, sowie die Herstellung der in vitro-Kultursysteme wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Abb. 3).

Kolonieninhibitionstest: Zur Untersuchung der verschiedenen Antiserumchargen auf ihre jeweilige Stammzelltoxizität wurde der Kolonieninhibitionstest durchgeführt. Hierbei wurden 4×10^6 nukleäre Knochenmarkszellen mit den verschiedenen Antikörperchargen, jeweils in unterschiedlichen Verdünnungen um die Konzentration ab der Kolonienhemmung auftritt bestimmen zu können, und jeweils in einem Endvolumen von 0,5 ml IC 199 Medium 30 Min. bei 4°C inkubiert. Ausgesuchtes normales Kaninchenserum wurde als Komplementquelle in einer Endverdünnung von 1:5 % dazugefügt und die Zellsuspension für weitere 60 Min. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden dann 1 x gewaschen und gezählt. Als Kontrolle diente normales Kaninchenglobulin an Stelle der Antikörperpräparationen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen im CFU-C Test kultiviert (32).

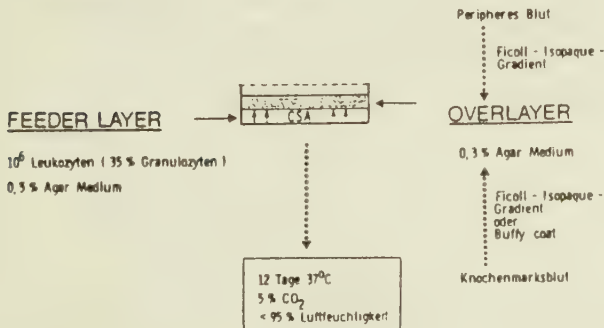


Abb. 3

2.2. Ergebnisse

Knochenmarkspender waren freiwillige gesunde Personen. Bei den meisten Chargen wurde zunächst im Versuchsansatz mit sehr großen Sprüngen zwischen den einzelnen Konzentrationen gemacht. Später wurde der genaue Hemmtiter, dann in einem 2. Ansatz mit kleineren Konzentrationsdifferenzen bestimmt (Tab. 1).

Aus Tabelle 1 kann man folgende Aussagen machen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Hemmung der Kolonienbildung bis zu einer Verdünnung von ca.	1 : 8000	1 : 1000	1 : 128	1 : 2000	1 : 512	1 : 2000	1 : 4000	1 : 512	1 : 512	1 : 1000	1 : 2000	1 : 1000	1 : 512	1 : 1000	1 : 2000

Jeweils eine Verdünnungsstufe höher als angegeben, konnte ein Stammzellwachstum nachgewiesen werden, welches vergleichbar war mit dem der Kontrollen.

Die Absolutwerte an CFU-C schwankten in den verschiedenen Ansätzen abhängig vom jeweiligen Knochenmarkspender, jedoch war die Inhibition bzw. Suppression des Stammzellwachstums bei den Verdünnungsreihen identisch.

Tabelle 2

Anzahl gebildeter Kolonien aus 2×10^5 Knochenmarkszellen bei Zugabe von ATG in der angegebenen Verdünnung.

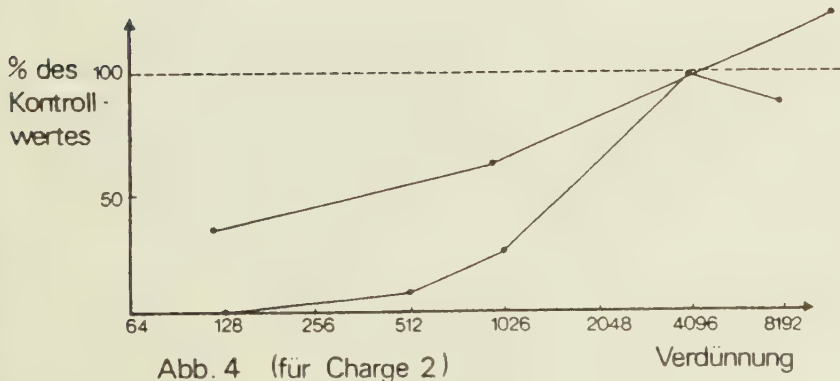
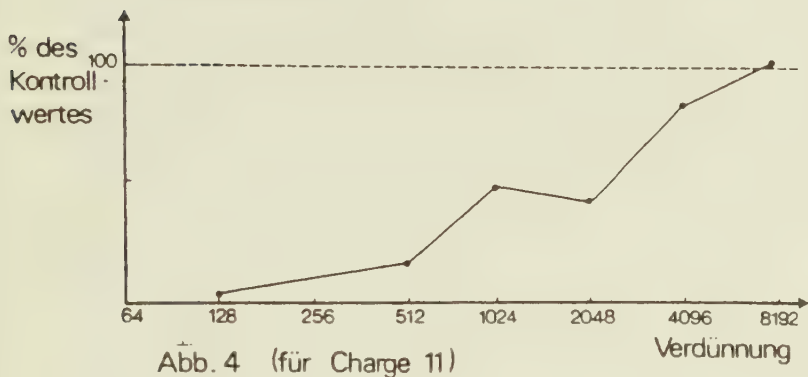
ATG Charge Ver- dünnung	1	2	3	4	5	6	7	8
	R-BC1	R-IC1	R-IC2	R-IC3	R-IC4	R-IC5	R-IC6	R-IC7
1 : 10	0	1	10	7	2	0	2	32
1 : 100	0	4	42	11	7	4	3	32
1 : 1000	0	71	116	17	23	82	22	53
1 : 10000	44	143	187	107	101	178	117	96
Kontrolle (nur mit Ke- nnterkomple- ment)	115	115	115	115	115	115	115	115

(Fortsetzung von Tabelle 2)

ATG Charge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ver- dünnung	R-BC1	R-TC1	R-TC2	R-TC3	R-TC4	R-TC5	R-TC6	R-TC7	H-ATG1	H-ATG2	H-ATG3	R-ATG1	R-ATG2	H-AlCl	H-AlCl ₃
1 : 4			0	0	0			2							
1 : 28		0	19			8	14		3	2	2	2	3	22	20
1 : 256			49												
1 : 512		1	41	0	4	7	17	68	52	23	9	6	25	10	6
1 : 1024	0	28	30	0		41		112	126	22	53	18	91	23	9
1 : 2040			38	23	56	257	83	115	130	115	46	124	107	83	40
1 : 4096	6	112		82		100	72	89	82	111	92	79	125	94	104
1 : 8192	49	100		48	60	93	113	83	123	99	112	95	118	130	113
1 : 16284	147			47	41		110	104							
1 : 32568	111														
Kontrolle (nur mit Ku- nindeskomple- ment)	114	114	45	45	45	103	103	103	109	109	109	109	96	96	96

Beispiele wie man aus einer graphischen Darstellung der Hemmung der Kolonienbildung den Hemmtiter erkennen kann:

WACHSTUM VON CFU-C NACH ATG:



2.3. Zusammenfassende Beurteilung

Die Verdünnungen, in denen die untersuchten ATG Chargen jeweils hemmende Aktivität auf das Wachstum von CFU-C zeigen, reichen von 1 : 128 bei RTC 2 bis zu 1 : 8000 bei R-BC 1. Eine Anwendung dieser Antiseren zur Vorinkubation eines Knochenmarks bei Knochenmarkstransplantationen zur Vermeidung einer graft-versus-host Reaktion kann wegen dieser Stammzell-Toxizität nicht empfohlen werden. Das Stammzellpotential wurde durch eine in vitro Vorinkubation weitgehend reduziert werden. Zur immunologischen Behandlung der SAA (siehe 3.1.4.) könnte man jedoch zumindest RTC 2 verwenden (siehe 4. Diskussion).

3. KLINISCHE TOXIZITÄT NACH ANWENDUNG VON ATG IN VIVO

3.1. Einleitung: Das Krankheitsbild der SAA

3.1.1. Definition

Die aplastische Anämie ist gekennzeichnet durch eine periphere Panzytopenie, die durch eine Verminderung aller drei hämopoetischen Zellreihen im Knochenmark verursacht wird (Ausnahme ist die Joseph-Diamond-Blackfan Anämie, bei der nur die Erythropoese gestört ist, weshalb Leukozyten und Thrombozyten normal sind). Es liegt also eine Anämie, Granulozytopenie und eine Thrombozytopenie vor, die entweder gemeinsam oder nacheinander auftreten können. Die Knochenmarkszellen verschwinden weitgehend oder vollständig und werden durch Fettgewebe ersetzt. Die Diagnose AA darf nicht gestellt werden, wenn die AA durch eine Vermehrung der Retikulinfasern oder die Anwesenheit von Speicherzellen oder Tumorzellen verursacht ist. Zur Definition der AA gehört auch ein protrahierter Beginn nach Exposition und ein protrahierter Verlauf der Erkrankung. Eine Ausnahme ist die durch hohe Medikamentendosen oder Bestrahlung induzierte AA, welche ohne ein freies Intervall auftritt.

3.1.2. Klinisches Bild

Wenn eine Ursache für die AA bekannt ist (z. B. nach einer Virusinfektion oder nach Medikamenten, siehe 3.1.3.) dann treten die Veränderungen im peripheren Blutbild nachca. 6 Wochen auf. Knochenmarkdepressionen nach Bestrahlung oder Cytostatikatherapie führt im Mittel bereits nach 2 Wochen zu Veränderungen im peripheren Blutbild.

Laborwerte

Erythropoese: Die meisten Patienten haben eine normochrome Anämie. Die Lebenszeit der Erythrozyten ist verkürzt und es können morphologische Veränderungen auftreten.

Leukozyten: Die Lymphozytenzahl ist uncharakteristisch. Lymphopenien können vorkommen. Monozyten, die für einen positiven CFU-C Test von entscheidender Bedeutung sind (31 S. 185), sind genauso wie die neutrophilen Granulozyten vermindert.

Thrombozyten: Über eine veränderte Morphologie oder Funktion ist nichts bekannt. Lediglich ihre Anzahl ist meist um mehr als 1/10 des Normalwertes reduziert.

Knochenmark: Ein typisches Bild bei AA wäre ein zellarmes Mark, welches Inseln mit hohem Gehalt an Lymphozyten, Plasmazellen, Gewebsbasophilen und Stromazellen enthält. Oft findet sich Fettmark oder eine fleckförmige Hyperplasie, die mit hypoplastischen Arealen abwechselt. Unreife Formen der Erythro- und Myelopoese sind typisch für letztgenannte Hypertrophie. Es gibt auch Fälle mit Lymphoid-plasmazellulärmastozytärer Hyperplasie. Erhöhte Werte erhält man bei der AA für Serum Erythropoetin und HbF. Meist ist auch die Blutsenkungsreaktion erhöht.

Durch die zahlenmäßige Erniedrigung der entsprechenden Zellen im peripheren Blut treten auf: verminderter Sauerstoffgehalt, Infektanfälligkeit und hämorrhagische Diathese. Außerdem sind die Pyruvatkinase- und Glutathion-reduktase Aktivität vermindert und die meisten anderen Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatzzyklus erhöht. Oft ist auch HbF auf 2 - 16 % erhöht.

3.1.3. Ursachen

Neben den angeborenen aplastischen Anämien (siehe 3.1.6.) gibt es die erworbenen. Von diesen wird etwa die Hälfte als "idiopathisch" bezeichnet, oft weil die Medikamentenanamnese nicht sorgfältig genug durchgeführt wurde. Bei den aplastischen Anämien infolge von Strahlung und PNH * weiß man über den Mechanismus, der zu der Krankheit führt, einigermaßen Bescheid. Bei den anderen Formen unterscheidet man 3 Pathomechanismen als mögliche Ursache: (7)

1. Fehlen und/oder defekte Reifung der Stammzellen
2. Störung des Mikromilieus im Knochenmark
3. Immunologisch bedingtes Knochenmarksversagen

Als auslösender Faktor kommen dafür in Frage:

- a) chemische Noxen (organische Lösungsmittel, Insektizide) (5, 30, 47)
- b) Medikamente (v. a. Chloramphenicol) (5, 15, 26, 7)
- c) Virusinfektionen (z. B. erkranken ca. 0,1 - 0,2 % aller Hepatitis-A-Patienten an AA) (7, 35)

* PNH = Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie.
Diese Krankheit wird durch einen Membrandefekt aller hämopoetischen Zellen verursacht. Dadurch kommt es zur Lyse der Zellen über Komplementwirkung und wenn Knochenmarkstammzellen betroffen sind, möglicherweise zur AA (21).

3.1.4. Definition der SAA

Für die hier vorgelegte Arbeit wurden ausnahmslos SAA- (severe aplastic anemia) Fälle bei Kindern untersucht. Nach einer Definition der "International AA Study Group" sind folgende Werte für die SAA kennzeichnend (1)

1. Knochenmark mit $< 25\%$ normaler Zellpopulation, oder Knochenmark mit $< 50\%$ normaler Zellpopulation und zugleich $< 30\%$ hämatopoetischen Zellen

bzw. 2. mindestens zwei der folgenden peripheren Blutwerte:

Granulozyten $< 500/\mu\text{l}$

Thrombozyten $< 20.000/\mu\text{l}$

Anämie mit Retikulozyten $< 10\ o/o$

Der normal erscheinende Retikulozytenwert, von beispielsweise $10\ o/o$, muß in Korrelation zu der bestehenden Anämie als Zeichen einer erythropoetischen Insuffizienz gesehen werden.

3.1.5. Prognose

Eine sehr schlechte Prognose haben auf jeden Fall die durch Chloramphenicol und die durch Hepatitis A bedingten aplastischen Anämien. Entscheidend für die Prognose ist bei den anderen AA, ob es sich um eine leichte, mittelschwere oder schwere AA (SAA - 3.1.4.) handelt. Dabei hat sich folgendes Schema zur Beurteilung der Prognose bewährt (8)

1. Peripheres Blut:
Neutrophile Granulozyten < 500/ μ l
Thrombozyten < 20.000/ μ l
Retikulozyten < 20.000/ μ l
2. Knochenmarkaplasie oder Hypoplasie in zwei Proben, von denen mindestens eine eine Biopsie sein muß.
3. Keine Cytostatika oder Strahlentherapie, in der unmittelbar vorausgegangenen Anamnese.

Wenn bei einem Patienten drei Parameter der unter 1 aufgelisteten zutreffen, d. h. wenn er eine SAA (siehe 3.1.4.) hat, dann wird seine Prognose in größeren Statistiken mit 30 % Überlebenswahrscheinlichkeit nach 4 Monaten angegeben (8, 15, 22). Nach 2 Jahren finden sich ebenfalls noch 30 % Überlebende. Die spontane Remissionsquote, die zwischen 2 und 24 Monaten nach Diagnose erreicht wird, beträgt etwa 15 %. Nach anderen Untersuchungen haben diese Patienten, bei denen außerdem ein zellarmes Knochenmark nachgewiesen wurde, eine mittlere Überlebenszeit von weniger als 6 Monaten, und 80 % der Patienten sterben innerhalb von 1 bis 2 Jahren (11). Die Überlebenden zeigen selten Besserung und benötigen meist Transfusionen mit Blutprodukten (21). Wenn allerdings nur 2 der unter 1 aufgelisteten Parameter zutreffen, so sind nach 2 Jahren

die Überlebenschancen 60 %. Die Vollremissionsquote beträgt dann 30 %.

Eine Studie von 48 Kindern mit AA im Alter von 0 - 15 Jahren ergab folgendes:

Nach 4 Monaten lebten noch 30 % von 26 Kindern, bei denen alle 3 der unter 1 aufgelisteten Parameter zutrafen. Nach derselben Zeit lebten noch 60 % von den 17 Kinder, bei denen nur 2 der unter 1 aufgelisteten Parameter zutrafen (29).

Für die Prognose der AA sind außerdem zusätzlich echte Lymphopenien ungünstig. Die übereinstimmende Meinung der Autoren ist, daß Geschlecht, Alter, Hb g/dl, HbF und CFU-C-Gehalt des Knochenmarks keinen Einfluß auf die Prognose haben.

3.1.6. Blackfan Diamond AA

Außer der SAA war für diese Arbeit noch die Blackfan Diamond AA relevant. Sie ist angeboren und es wird ein autosomal rezessiver oder -dominanter Erbgang vermutet.

Charakteristika der Blackfan Diamond AA:

Bei ca. 30 % körperliche Fehlbildungen wie Minderwuchs, Mikrocephalie, Gaumenspalte; die Erythrozyten haben oft die Charakteristika fetaler Zellen. Dieses Krankheitsbild manifestiert sich in 90 % der Fälle im 1. Lebensjahr. Spontanremissionen können in jedem Lebensjahr auftreten. Die Prognose ist nicht so schlecht wie beispielsweise bei der ebenfalls angeborenen Fanconi-AA, da lediglich das Wachstum und/oder die Differenzierung der erythropoetischen Zellen gestört ist, während Myelopoese und Thrombopoese weitgehend normal verlaufen. Ein besonderes Problem entsteht durch die Eisenüberladung bei häufigen Erythrozytentransfusionen.

3.2. Klinische Toxizitätsprüfung

3.2.1. Patienten, Untersuchungen

Zehn Kinder im Alter von 4 - 15 Jahren (Diagnosen in Tab. 2) mit SAA (3.1.4.) wurden mit ATG behandelt. Es wurden je nach Patient sehr unterschiedliche Dosen (1 - 35 mg/kg Körpergewicht/Tag) über 4 - 7 Tage verabreicht. 9mal wurde ATG-Serum vom Kaninchen, 2mal ATG-Serum vom Pferd verwendet (bei einem Patienten 2mal ATG-Therapie). Die Indikation zu dem Einsatz des ATG ergab sich aus der sonst sehr schlechten Prognose der SAA (3.1.5.).

Bei allen Patienten wurde untersucht, wie sich die peripheren Blutwerte während und nach der Behandlung mit ATG verändern. Bei einem Teil der Patienten wurden folgende Untersuchungen angestellt:

1. Untersucht wurde die Hemmwirkung des Knochenmarks von Patienten auf die CFU-C (2.1.) Kolonienbildung im gesunden Knochenmark. Dabei wurde eine definierte Menge (hier meist 10^5) Zellen vom KM des Patienten alleine, zusammen mit "normalen" KM-Zellen in einer sogenannten Co-culture, und das "normale" KM alleine in Kultur gebracht und jeweils die Anzahl von Kolonien in der Kultur = colony forming units in culture (CFU-C) bestimmt.
2. Untersucht wurde, ob das Serum von AA-Kranken hemmend auf die Potenz von Knochenmark Gesunder, CFU-C Kolonien zu bilden, wirkt. Dabei wird das Serum von Patienten zuerst in 10prozentiger, dann in 20prozentiger Verdünnung mit dem KM eines Gesunden in Kultur gebracht und wie bei 1 die Kolonien gezählt.

3. Gemessen wurde die E-Rosettenbildung, die ein Maß für die Anzahl und das normale Verhalten von ausdifferenzierten T-(Thymus) Lymphozyten liefert. Lymphozyten, die einen Rezeptor für Schafsaerythrozyten aufweisen, bilden sogenannte Rosetten. Auch B-Lymphozyten, wenn sie mit Ochsenerythrozyten und gleichzeitig Immunglobulinen zusammengebracht werden, bilden spontan charakteristische Rosetten (siehe Tab. 3).

Spontane Rosettenbildung mit unbehandelten (E_4) oder mit S-(2-aminoethyl) isothioronium bromid hydrobromid (AET) behandelten Schafsaerythrozyten wurde nach Jandal et al (17) und Kaplan und Clark (18) untersucht.

E-Rezeptoren, die bei 37°C stabil sind, wurden nach Inkubation über 1 Stunde bei 37°C untersucht (E_{37}).

C3 Rezeptoren wurden mittels eines Rosettentestes bei Ochsenerythrozyten (Eox) überprüft. Diese wurden sensibilisiert durch eine IgM-reiche Preparation von Kaninchen-Anti-Ochsen Erythrozyten Serum und frischem AKR/y Mäuse-Serum als Komplementquelle. (Thiel et al 44).

Zur Überprüfung des Fc-Rezeptors des IgG (typisch für Monozyten und B-Lymphozyten) wurde ein Rosettentest (Eox - AC), wie von Thiel et al (43) beschrieben, benutzt.

3.2.2. Ergebnisse

Bei 8 der 11 ATG-Therapien trat sofort eine anaphylaktische Reaktion ein (Kopfschmerzen, Fieber, urticarieller Ausschlag). Bei 7 ATG-Therapien trat eine Serumkrankheit auf (nach 7 - 14 Tagen Gliederschmerzen, Exanthem, Fieber, Schüttelfrost, Pruritus).

Während der ATG-Gabe konnte man folgende Veränderungen feststellen (siehe auch Abb. 5):

Retikulozyten: Soweit dies bei den ohnehin niedrigen Werten möglich war, konnte in 6 Fällen ein starker Abfall mit nachfolgender Normalisierung beobachtet werden. Nur in einem Fall (M. N.) war ein Anstieg der Werte während der Therapie zu erkennen.

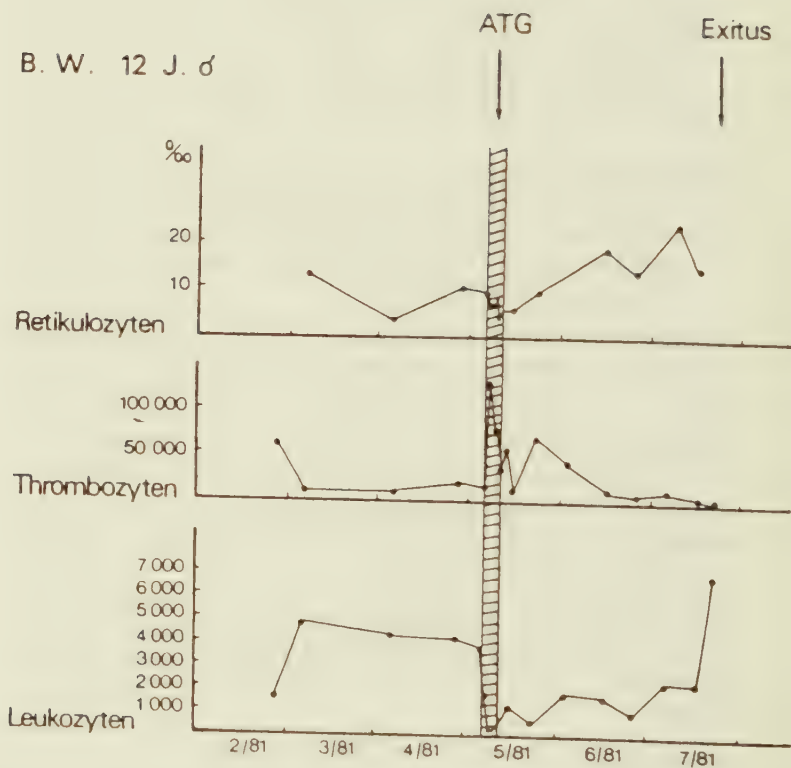
Thrombozyten: Unter Berücksichtigung der oft zur selben Zeit verabreichten Thrombozytenkonzentrate kann man zumindest in 4 Fällen ein Abfallen der Werte erkennen.

Leukozyten: Bei allen Patienten fielen die Werte sehr stark ab. Bis auf B. W. und B. M. waren jedoch bald wieder die vorherigen Werte meßbar. Zum Teil beruhte dieses starke Abfallen der Leukozytenwerte auf der Wirkung des ATG gegen T-Lymphozyten.

Granulozyten: Von den 8 Fällen in denen die Granulozytenwerte während der ATG-Therapie bestimmt wurden, konnte in zumindest 4 Fällen ein Abfall dieser Werte registriert werden.

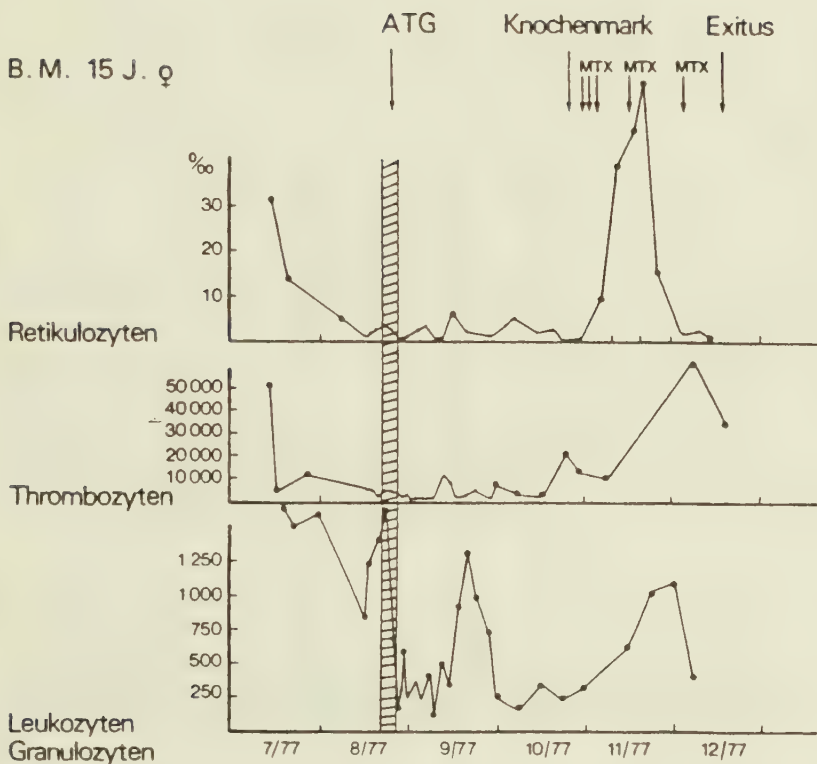
Lymphozyten: Wie nicht anders zu erwarten, fielen diese Werte während bzw. kurz nach der ATG-Therapie in 8 Fällen, davon in 4 Fällen sehr stark, ab. Bei B. M. wurde dies nicht untersucht. Bei C. D. konnte während beider Therapien nur ein mäßiger Abfall registriert werden. Bis auf B. Ms. trat nach ungefähr 10 Tagen jeweils wieder eine Normalisierung der Werte ein.

B. W. 12 J. ♂



250 ml Ery-Konz./Monat:	—	—	1	2	—	1
250 ml Thrombo-Konz./Monat:	—	—	1	3	3	3
ATG: Gesamtdosis	<u>165</u> mg @ 1 mg/kg/Tag					
Therapiedauer	<u>5</u> Tage					

(Abb. 5-1)



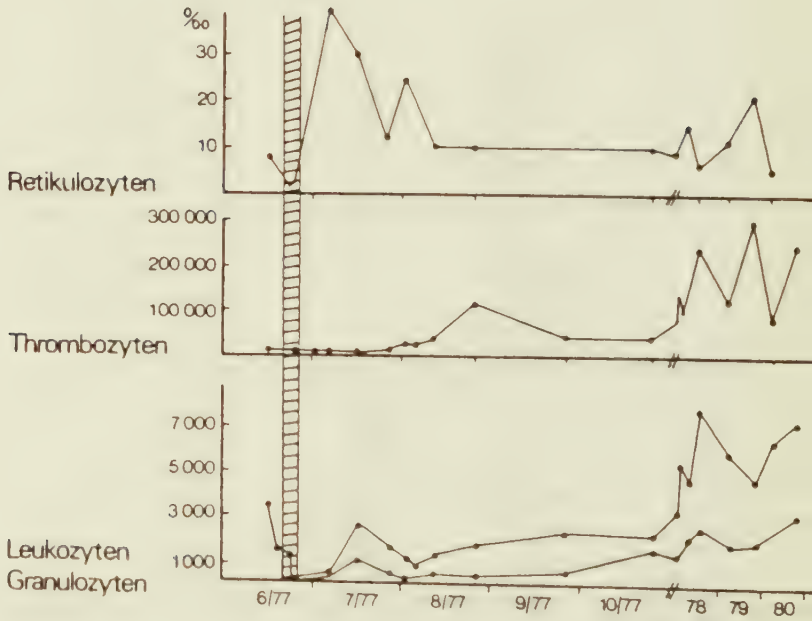
250 ml Ery - Konz./Monat :	2	4	3	6	4	2
250 ml Thrombo - Konz./Monat :	—	—	—	1	1	1
250 ml Granulo - Konz./Monat :	—	—	—	1	—	1

ATG : Gesamtdosis : 2080 mg $\hat{=}$ 9 mg/kg/Tag
 Therapiedauer : 5 Tage

(Abb. 5 - 2)

B. Ms. 14 J 5

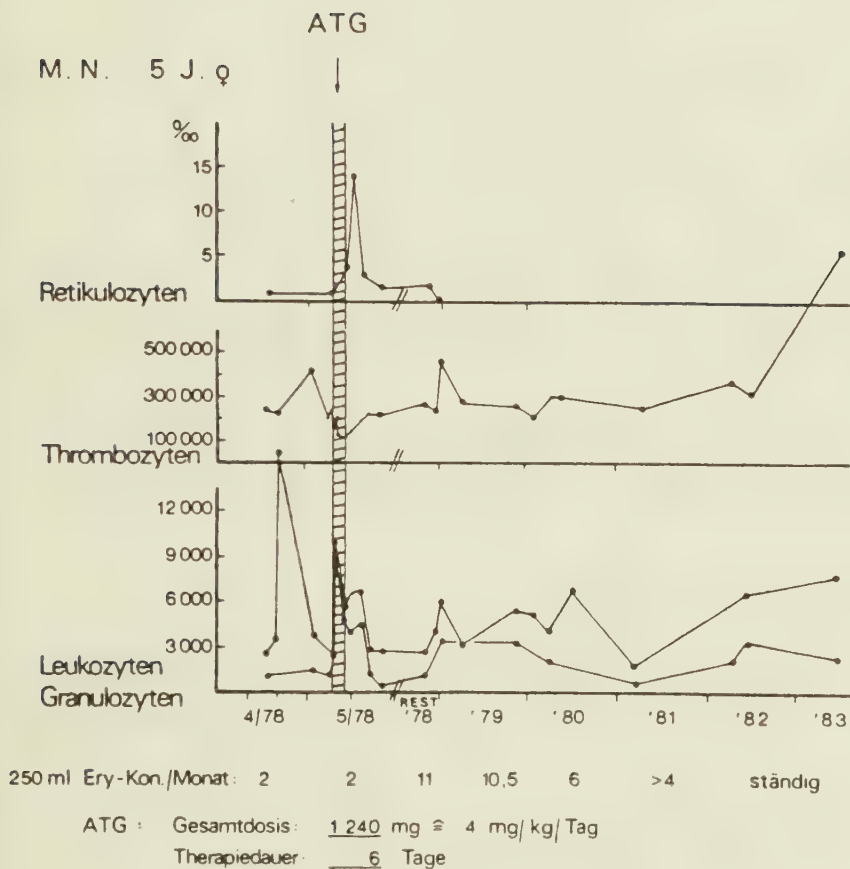
ATG



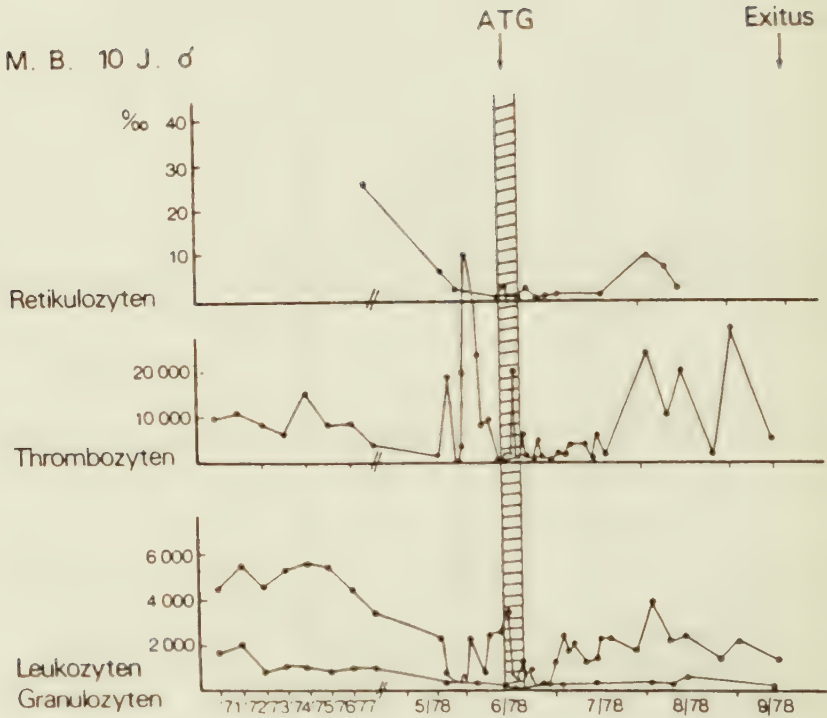
250 ml Ery-Konz./Monat	2	—	2	—	—	—	—	—
------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---

ATG Gesamtdosis 1.500 mg $\hat{=}$ 6 mg/kg/Tag
Therapiedauer 5 Tage

(Abb. 5-3)



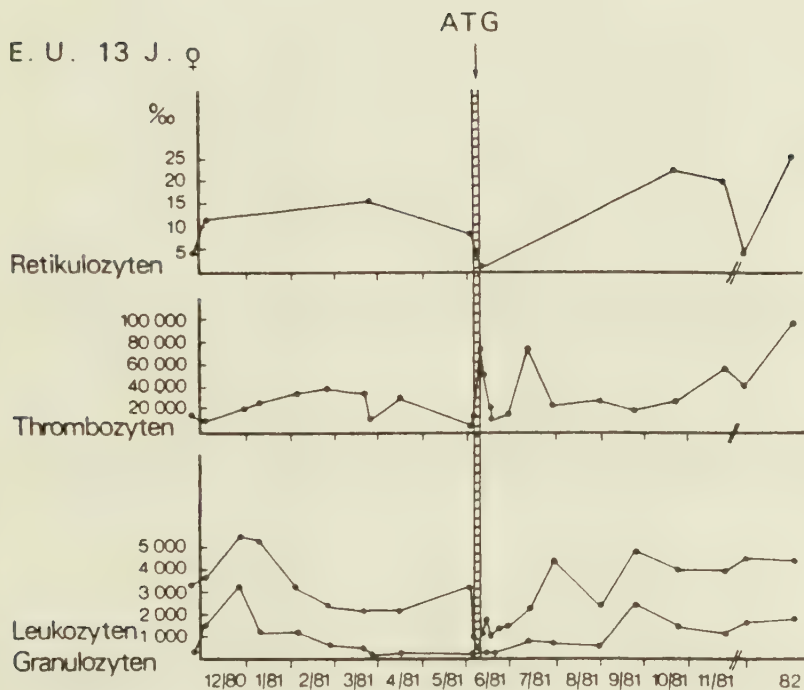
(Abb. 5 - 4)



250 ml Ery-Konz /Mon.	+	ständig
250 ml Thrombo-Konz /Mon.		ständig
250 ml Granulo-Konz /Mon.		+
250 ml Vollblutkonserven		+

ATG Gesamtdosis · 440 mg $\hat{=}$ 2 mg/kg/Tag
 Therapiedauer 6 Tage

(Abb. 5 - 5)



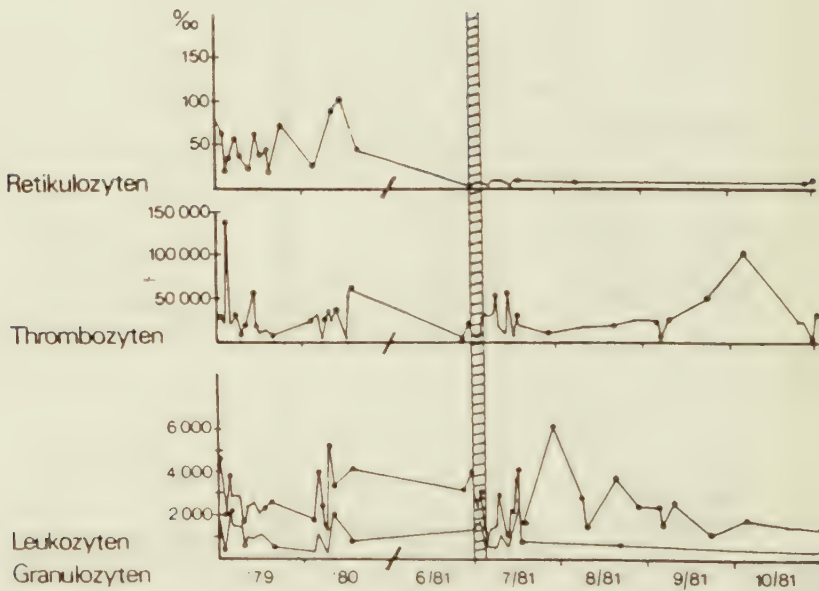
250 ml Ery-Konz./Monat:	1	4	—	—	—	—
250 ml Thrombo-Konz./Monat:		7	—	—	—	—

ATG : Gesamtdosis: 436 mg $\pm$ 1,8 mg/kg/Tag
 Therapiedauer: 5 Tage

(Abb. 5 - 6)

C. D. 6 J ♂

1. ATG

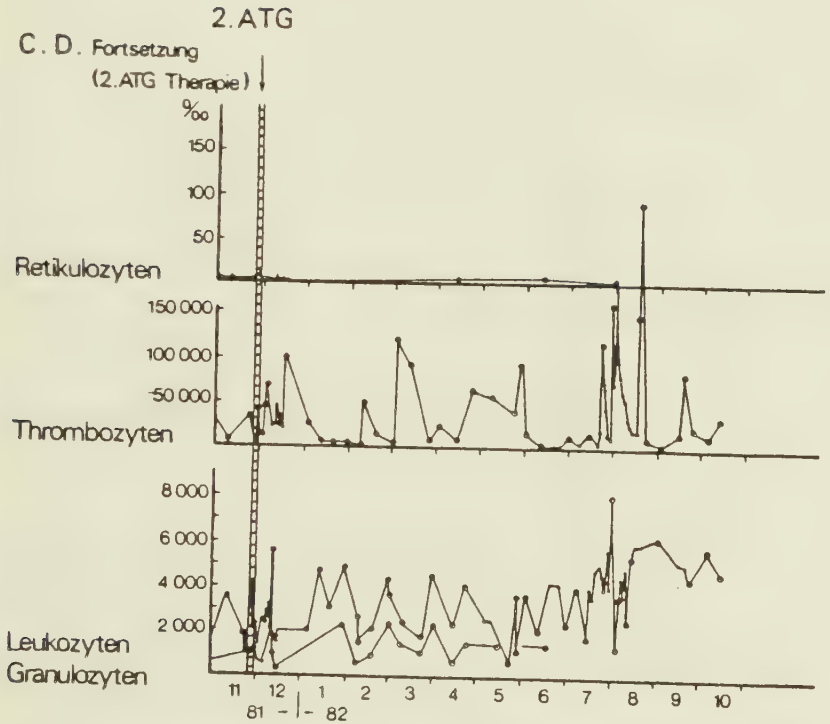


250 ml Ery - Konz /Monat:	> 1	> 6	2	> 2	1	ständig
250 ml Thrombo - Konz /Mon	> 1	2	2	> 8	1	ständig

ATG: Gesamtdosis 220 mg $\hat{=}$ 2 mg/kg/Tag

Therapiedauer 5 Tage

(Abb. 5 - 7)



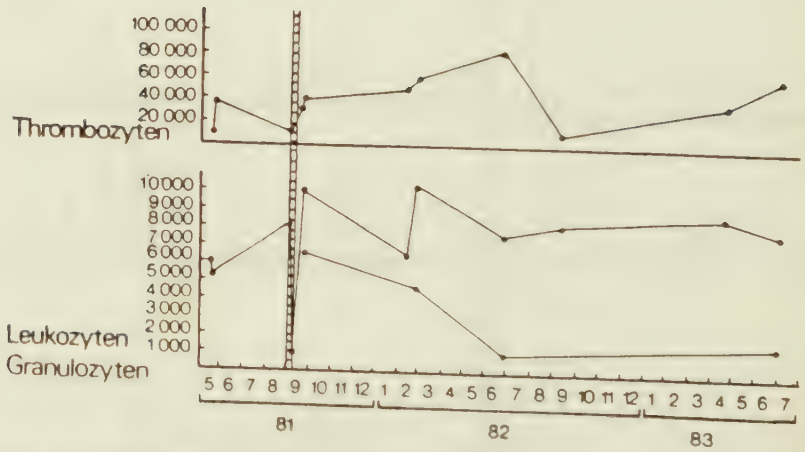
250 ml Ery-Konz./Monat : ————— ständig —————
 250 ml Thrombo-Konz./Mon.: ————— ständig —————

ATG : Gesamtdosis : 3200 mg $\hat{=}$ 35 mg/kg/Tag
 Therapiedauer : 4 Tage

(Abb. 5 - 8)

E. W. 12 J. ♂

ATG
↓



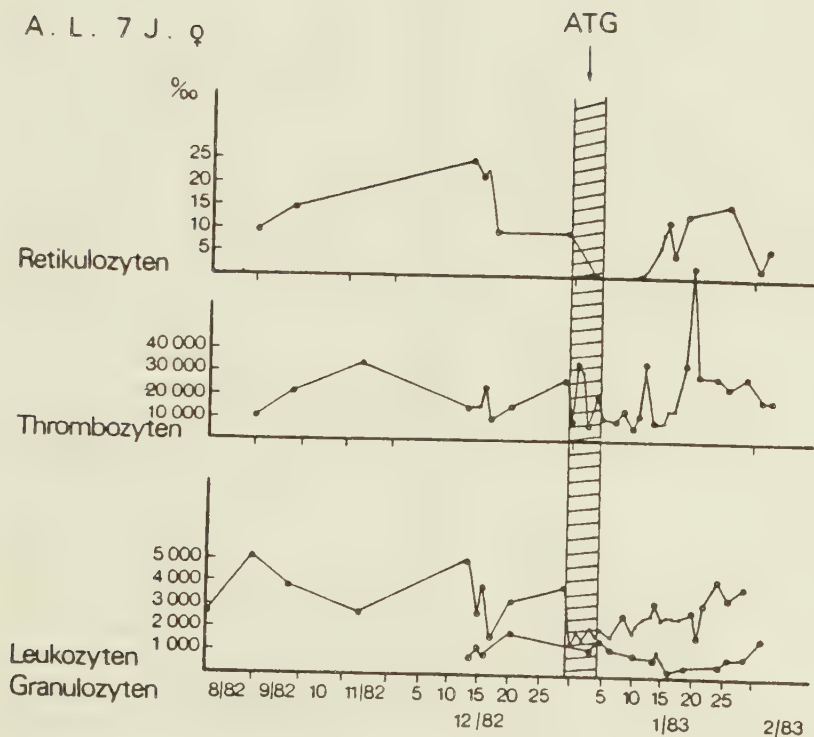
250 ml Ery-Konz / Mon.: 2

250 ml Thrombo-Konz / 2 Mon

ständig so, daß Thrombos nie unter 20.000

ATG Gesamtdosis 1.218 mg $\hat{=}$ 3 Tage 5 mg/kg/Tag und 2 Tage 7 mg/kg/Tag
Therapiedauer: 5 Tage

(Abb. 5 - 9)



250 ml Ery - Konz./Mon.:

2 (am 16.12.)

250 ml Thrombo-Konz./Mon.:

1 (am 15.01.)

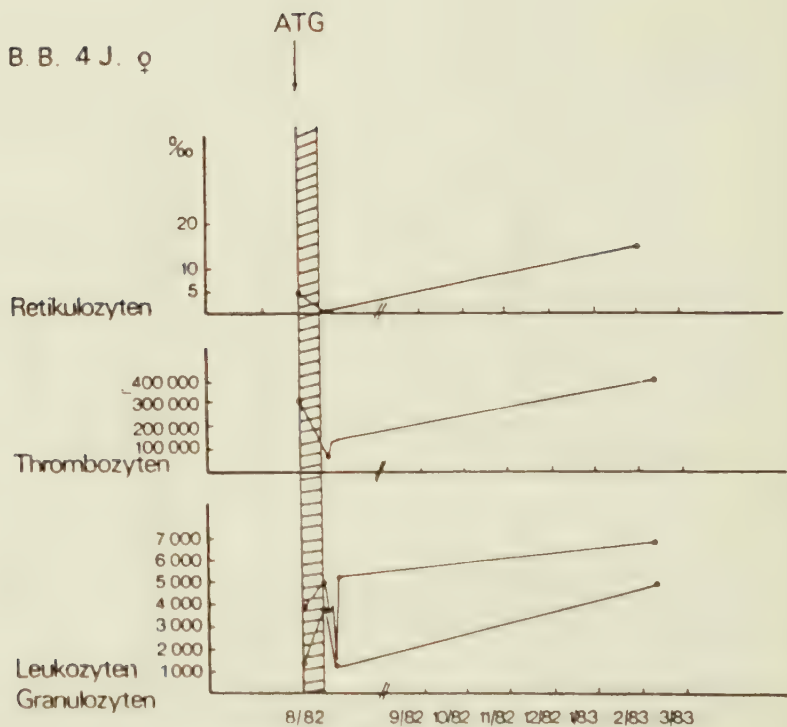
Blutkonserve/Mon.: 1

1 (am 15.01.)

ATG : Gesamtdosis 1.750 mg ± 10 mg/kg/Tag

Therapiedauer 7 Tage

(Abb. 5 - 10)



250 ml Ery - Konz /Monat	1	1	—	3	—	—	1
250 ml Thrombo - Konz /Monat	—	—	—	—	—	—	—
BK	—	1	1	1	—	—	—
ATG	Gesamtdosis 200 mg $\hat{=}$ 10 mg/kg/Ta						
	Therapiedauer 4 Tage						

(Abb. 5 - 11)

Für die einzelnen Patienten ergibt sich aus Abb. 5 folgendes:

B. W.:

(Anamnese ca. 1/2 Jahr; Ursache eventuell eine Virus-enzephalitis).

Durch das ATG wurden die T-Lymphozyten sehr stark supprimiert, erholten sich jedoch nach weniger als 14 Tagen. Leider war durch die ATG-Therapie kein nennenswerter Anstieg der Granulozyten (Anstieg der Granulozyten nur prozentual zu den Leukozyten, bedingt durch deren Abfall), Thrombozyten und Retikulozyten (dieser Wert war auch schon vor der Therapie mit ca. 10 o/oo relativ hoch zu erzielen). Der steile Anstieg der Thrombozyten zu Beginn der ATG war bedingt durch Thrombozytenkonzentrate (aus der Auflistung der Transfusionen unterhalb der Kurven in Abb. 5 erkennt man, daß ab Mai 81 monatlich 3 Thrombozytenkonzentrate gegeben werden mußten). Schließlich waren auch dadurch die niedrigen Thrombozytenwerte nicht mehr beherrschbar, so daß der Patient zweieinhalb Monate nach der ATG-Therapie schließlich an einer Gehirnblutung gestorben ist.

B. M.:

(Anamnese ca. 1/2 Jahr; Ursache eventuell eine Autoimmunkrankheit).

Die vor der ATG-Therapie schon niedrigen Retikulozyten und Thrombozytenwerte veränderten sich nicht, so daß man eine Knochenmarkstransplantation und Methotrexat-Gabe als Therapie versuchte (Pfeile über den Kurven in Abb. 5). Die Leukozyten fielen durch die ATG-Therapie stark ab. Der kurzzeitige Wiederanstieg der Leukozyten um den 22.09.77 wäre durch die Erholung der T-Lymphozyten erklärbar. Die Patientin verstarb 4 Monate nach ATG-Gabe und 30 Tage nach KM-Transplantation durch KM-Abstoßung.

B. Ms.:

(Anamnese ca. 1/2 Jahr: idiopatische Genese?)

Durch das ATG wurden die T-Lymphozyten anhaltend supprimiert. Circa 1 Woche nach der ATG-Therapie stiegen die Retikulozyten als Zeichen einer gesteigerten Hämopoese stark an. Die Thrombozyten-, die Leukozyten- und die Granulozytenwerte stiegen stetig an, so daß sie schließlich Normalwerte erreichten. In der Auflistung unter den Kurven kann man sehen, daß zuletzt keine Transfusionen mehr nötig waren. In diesem Fall kann von Heilung gesprochen werden.

M. N.:

(Blackfan Diamond AA (d. h. congenital))

Durch das ATG wurden die T-Lymphozyten sehr stark supprimiert, erholten sich jedoch nach weniger als 12 Tagen. Die Thrombozyten, Leukozyten und Granulozyten fielen nach der ATG-Therapie ab, erholten sich jedoch wieder und schwankten um die für die Blackfan Diamond AA typischen Normalwerte. Die Retikulozyten stiegen zwar wie bei B. Ms. nach der ATG-Therapie stark an, fielen dann jedoch endgültig total ab. Die Patientin ist auch 5 Jahre nach der ATG-Therapie noch auf regelmäßige Erythrozytenkonzentrate angewiesen.

M. B.:

(Anamnese ca. 8 Jahre: idiopatische Genese?)

Durch das ATG wurden die T-Lymphozyten sehr stark supprimiert, erholten sich jedoch nach weniger als 13 Tagen. Die Retikulozytenwerte, die vor der ATG-Therapie schon niedrig waren, stiegen 1 1/2 Monate danach auf 10 o/oo an, fielen aber bald wieder ab. Bei den Thrombozyten zeigte sich keine Veränderung in einer bestimmten Richtung. Einzelne hohe Werte sind auf die ständig verabreichten Thrombozytenkonzentrate zurückzuführen. Die

Leuko- und Granulozytenwerte, welche kurz nach der ATG-Therapie erniedrigt waren, erreichten lediglich Werte um $2500/\text{mm}^3$ bzw. $250/\text{mm}^3$. Der Patient verstarb 6 Monate nach ATG-Gabe, nachdem er ständig auf Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate angewiesen war.

E. U.:

(idiopathische Genese?)

Durch das ATG wurden die T-Lymphozyten supprimiert, erholten sich aber schon nach weniger als 9 Tagen. Nach Erniedrigung der Retikulozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenwerte durch das ATG stiegen Retikulozyten, Thrombozyten, Leukozyten und Granulozyten auf annähernd normale Werte an. Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate waren lediglich während der ATG-Therapie nötig (der relativ hohe Thrombozytenwert am Ende der ATG-Therapie kommt daher). Da keine Blutungen mehr auftraten und keine Transfusionen mehr nötig waren, gilt die Patientin als geheilt.

C. D.:

(Ursache congenital oder durch BCG-Impfung)

1. ATG-Therapie: Durch das ATG wurden die T-Lymphozyten nur mäßig supprimiert. Die Retikulozyten blieben bei Werten um 5 o/oo. Die Thrombozyten stiegen zwar bis Anfang 10/81 an, es wurden jedoch laufend Thrombozytenkonzentrate gegeben. Die Leukozyten und die Granulozyten fielen kurz nach der 1. ATG-Therapie deutlich ab, erreichten dann aber Werte wie vor der Therapie, eher etwas niedriger.

2. ATG-Therapie: Nach der 2. Therapie wiesen die T-Lymphozytenwerte keinerlei Veränderungen auf. Die Retikulozyten zeigten nicht das kompensatorische Ansteigen wie in manchen der anderen Fälle, sondern fielen sogar noch stärker ab. Die Thrombozyten konnten nur durch laufende

Thrombozytenkonzentrate kurzzeitig auf Werte von ca. $100.000/\text{mm}^3$ gebracht werden. Auch Erythrozytenkonzentrate waren laufend nötig, wie aus der Auflistung unter den Kurven hervorgeht.

E. W.:

(Anamnese mindestens 6 Jahre; idiopatische Genese?)

Durch das ATG wurden die T-Lymphozyten supprimiert, erholten sich jedoch nach weniger als 11 Tagen.

Die Retikulozyten wurden leider nicht gemessen. Der erste Anstieg in der Thrombozytenkurve wurde durch ein Thrombozytenkonzentrat verursacht. Nach der Therapie stiegen die Thrombozyten jedoch stetig an. Es waren jedoch immer wieder Thrombozytenkonzentrate nötig, da die Thrombozyten so wie in 9/82 dennoch öfter auf Werte unter $20.000/\text{mm}^3$ zurückfielen. Die Leukozyten fielen sofort nach der ATG-Therapie stark ab, erreichten dann aber höhere Werte als davor. Insgesamt ist jedoch bei den Thrombozyten und den Leukozyten eine steigende Tendenz erkennbar. In diesem Fall kann man zumindest von starker Besserung sprechen. Bemerkenswert sind die niedrigen Granulozytenwerte in 6/82 und 7/83.

A. L.:

(Anamnese ca. 1 Jahr; idiopatische Genese?)

Durch das ATG wurden die T-Lymphozyten supprimiert, erholten sich jedoch schon nach 6 Tagen.

Die Retikulozyten fielen nach der ATG-Therapie auf 0 o/oo ab, stiegen dann jedoch für ca. einen halben Monat auf Werte um 15 o/oo an.

Die Thrombozyten- und die Leukozytenwerte veränderten sich durch die ATG-Therapie nicht wesentlich. Eine steigende Tendenz ist allerdings erkennbar. Der hohe Thrombozytenwert Mitte 1/83 wurde durch ein Thrombozytenkonzentrat (am 15.01.83 z. B.) verursacht.

Wie bei E. W. ist das Abfallen der Granulozyten bemerkenswert, die jedoch spätestens Ende 1/83 wieder anstiegen. Die Patientin konnte nicht weiter beobachtet werden, da sie sich jetzt in den Vereinigten Arabischen Emiraten aufhält.

B. B.:

(Blackfan Diamond AA (d. h. congenital))

Durch das ATG wurden die T-Lymphozyten sehr stark supprimiert.

Die Retikulozyten-, Thrombozyten-, Leukozyten- und Granulozytenwerte fielen sofort nach der ATG-Therapie deutlich ab. Die Retikulozyten stiegen dann jedoch auf Werte von 5 - 16 o/oo bis zu maximal 33 o/oo an. Die Leukozyten erreichten jedoch 4 Tage nach der Therapie wieder die für die Blackfan Diamond AA typischen Normalwerte. Ähnlich war es mit den Thrombozyten, allerdings nach etwas längerer Zeit. Allerdings ist zu beachten, daß in 9/82, 10/82 und 11/82 je eine Blutkonserve transfundiert wurde. Diese Blackfan Diamond AA konnte auch nach anschließender hochdosierter Cortisontherapie, ebenso wie von M. N., nicht beeinflußt werden, so daß immer wieder Erythrozytenkonzentrate benötigt wurden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß von 10 Patienten 3 gestorben sind (B. W. 2 1/2 Monate nach der ATG-Therapie, B. M. 3 1/2 Monate danach, M. B. 3 Monate danach). 2 Patienten kann man als geheilt betrachten (B. Ms., E. U.), und bei 1 Patienten ist zumindest eine Besserung (E. W.) eingetreten.

Bei B. W., E. U. und C. D. wurde vor der ATG-Therapie die Anzahl und das Verhalten von T- und B-Lymphozyten bezüglich ihrer Fähigkeit E-Rosetten zu bilden, untersucht (siehe 3.2.1. unter 3). In Tab. 3 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Auffällig ist der Mangel an E₄-rosettenformenden Lymphozyten.

Tabelle 3

E-Rosettenbildung von T- und B-Lymphozyten

	Normalwert	B. W.	E. U.	C. D.
E_{40} (Indikator für E-Rosettenbildung von T-Lymphozyten)	$60 \pm 10 \%$	13 %	28 %	0 %
E_{370} (wie E_{40} jedoch normalerweise niedriger da Dissoziation erfolgt)	10 % von E_{40}		4 %	
E_{AET} (wie E_{40} jedoch normalerweise höher da durch Zugabe von AET die Bindung stabilisiert wird)	$< E_{40}$ (ca 70 %)		36 %	
$E_{0x}A$ (Indikator für E-Rosettenbildung von B-Lymphozyten)	10 - 15 %			17 %
$E_{0x}-AC$ (Indikator für E-Rosettenbildung von Fc-haltigen B-Lymphozyten)	$< E_{0x}A$			7 %

Die Co-Kultur und der CSA-Test, vor der ATG Gabe durchgeführt, ergaben folgendes (siehe Tabelle 4 und 5):

1. Knochenmark von Patienten hemmt nicht die Proliferation von normalem Knochenmark.
2. Serum von Patienten hat ebenfalls keinen hemmenden Einfluß.
3. Bei C. D. konnte bei beiden Verfahren sogar eine leichte Stimulation entdeckt werden.
4. Bei E. W. war in beiden Verfahren 3 Monate nach den ersten Untersuchungen plötzlich eine Hemmung festzustellen.

Die selben Untersuchungen, nach ATG Gabe durchgeführt, ergaben folgendes (siehe Tabellen 4 und 5):

1. Bei A. A. 1 Woche nach ATG Gabe im CSA-Test Hemmung.
2. Bei A. A. und E. E. 1 1/2 bzw. 10 Monate nach ATG Gabe im CSA-Test, bei E. W. auch in der Co-Kultur, keine Hemmung.

Tabelle 4

Co-Kultur

(alle Untersuchungen bis auf die angegebenen wurden vor der ATG Therapie gemacht)

	CFU-C/ 2×10^5 Patientenzellen	CFU-C/ 2×10^5 normale Zellen	CFU-C/ 2×10^5 P.Z. 2×10^5 n.Z.
B. W.	1	63	68
E. U.	1	8	10
C. D.	7	105	180
E. W.	2 (nach 3 Mon. 8) 5 10 M. nach ATG	59 (nach 3 Mon. 18) 67 10 Mon. n. ATG	59 (nach 3 Mon. 4) 76 10 Mon. n. ATG
A. A.	2	31	31

Tabelle 5

CSA-Test

(alle Untersuchungen bis auf die angegebenen wurden vor der ATG Therapie gemacht)

	CFU-C/ 2×10^5 normale KMzellen	CFU-C/ 2×10^5 normale KMzellen + 10%iges Patientenserum	CFU-C/ 2×10^5 normale KMzellen + 20%iges Patientenserum
E. U.	19	19	17
C. D.	66	88	89
E. W.	28 (nach 3 Mon. 14) 57 10 Mon. nach ATG	30 (nach 3 Mon. 5) 53 10 Mon. nach ATG	27 (nach 3 Mon. 4) 70 10 Mon. nach ATG
A. A.	73 7 Tage nach ATG 90 1 1/2 M. n. ATG	51 7 Tage nach ATG 77 1 1/2 M. n. ATG	34 7 Tage nach ATG 90 1 1/2 M. n. ATG

4. DISKUSSION

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit der Möglichkeit einer sogenannten immunsuppressiven Therapie der schweren aplastischen Anämie im Kindesalter. Als Immunsuppressivum wurden Anti-Thrombozytenglobuline eingesetzt. In einem ersten Teil sollte überprüft werden, ob es ein für die Klinik relevantes Testmodell gibt, das eine Voraussage ermöglicht, ob das einzusetzende Anti-Thymozytenglobulin untöxisch auf die vorhandene Resthämoopoese des Patienten wirkt. Dabei kam es in erster Linie darauf an, bei verschiedenen gewählten Chargen eines Anti-Thymozytenglobulins vergleichbare standardisierbare Resultate mittels der angewandten Kulturmethode für hämoopoetische Stammzellen zu entwickeln.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte retrospektiv bei Patienten, die bereits Anti-Thymozytenglobulin erhalten hatten, die klinische Wirkung, insbesondere die Toxizität des angewandten ATG ermittelt werden.

Zur hämoopoetischen Stammzelle

Definition

Aufgrund zahlreicher Untersuchungen wird heute innerhalb der Hämatologie ein Modell des hämoopoetischen Zellerneuerungssystem akzeptiert, das folgendermaßen aussieht:

Von einer pluripotenten Stammzelle, die sowohl die Fähigkeit hat, sich selbst zu reproduzieren wie auch eine Differenzierungsfähigkeit in die verschiedenen Formen der Hämoopoese aufweist, wird sowohl bei der Entwicklung des Knochenmarkes als auch bei jedem regenerativen Vorgang eine gestörte oder verminderte Hämoopoese erneuert. Die pluripotente Stammzelle differenziert sich in einem ersten Schritt in die sogenannten

determinierten Stammzellen, die eine geringe Fähigkeit zur Selbsterhaltung haben und in erster Linie durch rasche Zellteilung die Differenzierung in die Erythro-, Granulo- und Megakaryozytopoese besorgen. Die Existenz pluripotenter Stammzellen wurde im Tierexperiment durch die sogenannte Milz-Kolonientechnik nachgewiesen: etwa 10 Tage nach Transfusion von Knochenmarkszellen sind in der Milz von letal bestrahlten Mäusen makroskopisch sichtbare Zellkolonien vorhanden. Die Anzahl dieser Kolonien in der Milz ist proportional der Anzahl übertragener Stammzellen. Diese Milzkolonie bildenden Zellen werden auch Colony forming unit (CFU) genannt. Durch histologische Untersuchungen dieser Kolonien wurde eindeutig nachgewiesen, daß in den Kolonien sowohl Erythro- wie Myelo- wie Megakaryozytopoese existiert. Beim Menschen ist die Existenz der pluripotenten Stammzelle insbesondere durch die Erfahrung der Knochenmarkstransplantation sowohl bei der Zwillings transplantation wie auch der allogenen HLA-identischen Transplantation gesichert (3, 4, 6, 24, 25, 37, 46, 48).

Zum Nachweis der determinierten Stammzellen insbesondere der für Myelopoese determinierten Stammzellen wurde von Bradley und Metcalf sowie Pluznik und Sachs eine der Milz-koloniemethode sehr ähnliche in vitro Methode entwickelt, bei der Zellen nachgewiesen werden, die im semisoliden Medium einer speziellen Agar-Kultur Granulozytenkolonien bilden. Diese Zellen werden CFU-C (= colony forming unit in culture) bezeichnet. Sie bilden sich nur unter dem Einfluß eines Kolonie-stimulierenden Faktors, dem CSF (6, 37).

Für die Pathogenese der aplastischen Anämie im Kindesalter werden folgende Mechanismen diskutiert:

1. Stammzellspeicher Veränderungen

Wird bei Patienten mit aplastischer Anämie die erwähnte CFU-C Technik angewandt, so ergibt sich in jedem Fall eine Erniedrigung des determinierten Stammzellgehaltes bei den Patienten. Auch bei den von uns untersuchten Patienten, bei denen eine CFU-C durchgeführt wurde, ist eindeutig eine extreme Erniedrigung des CFU-C Gehaltes vor der Behandlung erkennbar. Obgleich bei Menschen Nachweismethoden für die pluripotente vorgeschaltete Stammzelle nicht existieren, kann man davon ausgehen, daß über den Nachweis der Tochtergeneration der determinierten Stammzelle eine Information über den ebenfalls geschädigten verminderten pluripotenten Stammzellspeicher gewonnen wird. Auch tierexperimentell konnte bei einem Aplasie-modell nach Busulfangabe dieser Nachweis bei der Maus mit der CFU-C Milzmethode nachgewiesen werden (28). Betrachtet man den verminderten Stammzellpool bei aplastischen Anämien, so kommen verschiedene Möglichkeiten in Frage:

1. CFU-C Kolonien könnten deshalb nicht wachsen, weil der normalerweise beim Menschen vorhandene Stimulationsfaktor fehlt. Dafür existiert bisher keinerlei Anhalt, auch die eigenen in der Arbeit vorgelegten Arbeiten zeigen, daß kein Mangel an CFS existiert.
2. Ein verminderter Stammzellpool des Knochenmarks bei aplastischer Anämie könnte daher zustande kommen, daß die Fähigkeit zur Selbstreplikation weitgehend verloren gegangen ist, so daß im Wege der Differenzierung allmählich das Krankheitsbild der aplastischen Anämie entsteht. Daß dies zumindest nicht bei allen Patienten der Fall ist, zeigen sogenannte Spontanremissionen

oder Therapieeffekte nach immunsuppressiver Behandlung bei Patienten mit aplastischer Anämie (12). Gerade aber die durch immunsuppressive Behandlung erreichten Erfolge weisen jedoch darauf hin, daß ein alleiniger Mangel an Stammzellen nicht das Problem bei der aplastischen Anämie sein kann. Hauptargument für eine solche Annahme war die Möglichkeit, eine aplastische Anämie durch die Transfusion eines Knochenmarks vom eineiigen Zwilling zu heilen (45). Dieser sogenannten identischen Knochenmarkstransplantation wird keine immunsuppressive Therapie vor der Knochenmarkstransplantation vorausgeschickt, da keinerlei immunologische Schranken zwischen Spender und Empfänger zu überwinden sind. Das Argument wird aber durch die Tatsache entkräftet, daß bei der Transplantation des Knochenmarkes auch Lymphozyten des Spenders neben den Knochenmarkstammzellen übertragen werden.

2. Immunologische Faktoren

Die Beobachtung, daß Knochenmarkzellen oder periphere Blutzellen von einigen Patienten mit aplastischer Anämie das Koloniewachstum normaler menschlicher Knochenmarkszellen negativ beeinflussen und daß nach Entfernung von T-Lymphozyten durch Anti-Thymozytenglobulin ein verbessertes Wachstum der Stammzellkolonien eintrat, haben Anlaß für die Hypothese gegeben, daß Subpopulation von T-Zell-Lymphozyten sogenannte Suppressorimmunozyten die Differenzierung von Stammzellen bei aplastischer Anämie behindern (13, 19, 20, 11). Zahlreiche Untersuchungsgruppen haben immer wieder versucht, eine Korrelation zwischen der Anzahl von T-Lymphozyten im Knochenmark der Patienten und den positiven oder negativen Effekt von Anti-Thymozytenglobulin herzustellen. Diese Untersuchungen wurden sowohl durch immunologische

Bestimmung der T-Lymphozyten Population wie auch durch die sogenannte Co-Kulturmethode durchgeführt (31, 41, 27).

Eine klare Korrelation zwischen diesen Daten und dem Erfolg oder Mißerfolg einer Anti-Thymozytenglobulinbehandlung ist bis heute jedoch nicht gegeben. Auch in den eigenen Untersuchungen zu diesem Punkt konnten wir keine Korrelation weder in der Knochenmark-Co-Kultur noch in den immunologischen Untersuchungen zum T-Zell-Gehalt rosettenbildender T-Lymphozyten feststellen. Durch den in Zukunft möglichen Einsatz von mononuklearen Antikörpern, die spezifisch Suppressor-immunozysten erfassen können, ist es jedoch durchaus denkbar, daß eine Korrelation dieser Art gefunden werden kann, d. h. daß man durch ein Screening vor der Behandlung feststellen könnte, welche Patienten besonders gut geeignet sind für eine ATG Behandlung. Tatsache bleibt jedoch, daß ein Großteil der aplastischen Anämien, wie immer die bisher gefundenen immunologischen Befunde waren, durch ATG geheilt werden konnten. Der Mechanismus des ATG besteht möglicherweise nicht allein in der Inhibition von sogenannten Suppressor-immunozysten: Aufgrund in vitro Untersuchungen mit CFU-C Methode konnte z. B. gezeigt werden, daß ATG Stammzellen direkt ohne einen immunologischen Prozeß stimulieren kann. So konnte von B. Netzel der eigenen Untersuchungsgruppe gezeigt werden, daß bei Kurzzeit-Inkubation normaler Knochenmarkszellen mit ATG falls kein Komplement zugesetzt wurde, die Anzahl von CFU-C deutlich zunimmt. Dieser Effekt war auch feststellbar, wenn man absorbiertes ATG mit Komplement Knochenmarkskulturen zugab. Eine mögliche Hypothese ist, daß die Stammzellen durch ATG besser auf den Colony Stimulating factor reagieren (33).

Im ersten Teil der vorgelegten Arbeit wurde an verschiedenen Chargen von ATG mittels der CFU-C Methode ermittelt, ob das jeweilige ATG eine Kreuzreaktion gegen hämopoetische Stammzellen aufweist und damit für den Patienten nachteilige Folgen mit sich brächte. Es hat sich wie gezeigt werden konnte herausgestellt, daß eine hemmende Aktivität auf das Wachstum von CFU-C bis zu einer Verdünnung von 1 : 8000 festgestellt wurde. Lediglich RIC 2, welches erst ab einer Verdünnung von 1 : 128 hemmend wirkte, kann vom klinischen Standpunkt aus für den Einsatz beim Patienten als geeignet bezeichnet werden. Im Vergleich ist eine Hemmung von 1 : 200 festgestellt worden bei denjenigen ATGs, die bei dem im zweiten Teil der Arbeit berichteten Therapien zur Anwendung kamen. Die unterschiedliche Wirkung auf den hämopoetischen Stammzellpool ist abhängig von der jeweiligen Absorption der Seren, wie es in früheren Berichten (31) durch Untersuchung von stark oder teils gereinigtem und absorbiertem ATG gezeigt werden konnte. Insgesamt hat sich bei den Untersuchungen herausgestellt, daß ein verläßlicher Parameter für unerwünschte Nebenwirkungen auf die Resthämpoese der Patienten die CFU-C Methode darstellt und daß kommerziell hergestellte ATG Chargen nur in seltenen Fällen geeignet sind für den klinischen Einsatz.

Welche Indikationen ergeben sich nun für den Einsatz von ATG?

Eine ATG Präparation, die den oben geschilderten Anforderungen entspricht und darüber hinaus eine definitive unveränderte spezifische anti-T-Lymphozyten-Toxizität aufweist, sollte bei folgenden Patienten angewandt werden:

1. Die Prämisse für einen Therapieversuch ist der Nachweis, daß es sich bei der aplastischen Anämie um eine definitive Form der schweren aplastischen Anämie handelt (siehe 3.1.4. und 3.1.5.). Nur bei diesen Patienten ist es aufgrund der schlechten Prognose gerechtfertigt,

sogenannte konventionelle Therapie zu unterlassen. Während beim Patienten mit mittelschwerer aplastischer Anämie der Einsatz von ATG verfehlt ist, da:

1. das Krankheitsbild nicht vital die Patienten gefährdet,
 2. spontane Remissionen auch ohne spezifische Therapien möglich sind und
 3. die Nebenwirkungen der ATG Therapie berücksichtigt werden müssen: Diese Nebenwirkungen bestehen in einer herabgesetzten Immunkompetenz während und kurz nach der Therapie, bedingt durch die Zerstörung von T-Lymphozyten, einer möglicherweise auftretenden anaphylaktischen Reaktion gegen das Fremdeiweiß, und im Auftreten einer Serumkrankheit. Tatsächlich traten bei acht der elf Patienten, die in unserer Klinik ATG erhielten, anaphylaktische Reaktionen auf und bei sieben eine Serumkrankheit.
2. Liegt das Krankheitsbild der schweren aplastischen Anämie vor, existiert aber keine Möglichkeit eine Knochenmarkstransplantation durchzuführen, da kein HLA-identischer Spender vorhanden ist, ist ebenfalls eine ATG Therapie indiziert. Ein weiterer Grund für die Präferenz der Anwendung von ATG kann sein, daß der Patient mit schwerer aplastischer Anämie lange Zeit ohne Erfolg konventionell behandelt wurde und obgleich ein HLA-identischer Spender zur Verfügung stünde, die Aussichten für einen Heilungserfolg durch Knochenmarkstransplantation durch die Dauer der Anamnese geschwächt sind. Diese schlechtere Prognose bei Patienten mit langer Anamnese erklärt sich daher, daß sich durch Polytransfusion die Gefahr der sogenannten Abstoßung des Knochenmarkes dramatisch erhöht. Es kommt hier zu

einer Sensibilisierung des Empfängers gegen Fremdlimphozyten durch die durchgeführten Transfusionen. Schließlich gibt es weitere Gründe, die eine Knochenmarkstransplantation verbieten, z. B. Weigerung des Patienten oder des Spenders.

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit dargelegt wurde, sind insgesamt die Erfolge einer immunsuppressiven Therapie gegenüber den Erfolgen einer Knochenmarkstransplantation bei entsprechender Indikation vergleichbar. In einem Fall der Knochenmarkstransplantation kommt es bei einem Teil der Patienten zur Abstoßungsreaktion mit deletärem Ausgang; im anderen Fall bei der ATG Behandlung ist nur bei einem Teil der Patienten die hämatologische Rekonstitution möglich. Vorteil der ATG Behandlung ist jedoch, daß Todesfälle durch die ATG Behandlung selber nicht aufgetreten sind. In unserem Patientenquart verstarb keiner der untersuchten Patienten während der Therapie. Drei Todesfälle, die bekannt wurden, traten nach 2 1/2, 3 und 3 3/4 Monaten auf.

3. ATG Behandlung beim Krankheitsbild Blackfan Diamond

Beim Krankheitsbild der angeborenen Erythroblastophthie (Blackfan Diamond) ist eine besondere Situation dadurch gegeben, daß die Erkrankung bekanntlich alleine die Erythropoese betrifft und außer durch eine mögliche Eisenüberladung des Organismus keine vitale Bedrohung des Patienten durch die Krankheit existiert. Aus diesem Grunde besteht in aller Regel keine Indikation für eine Knochenmarkstransplantation, da diese aus den oben genannten Gründen mit einer hohen Mortalitätsrate aufgrund der Abstoßungsreaktion und möglicher Infektionen durch die immunsuppressive Vorbehandlung belastet ist. Es ist daher durchaus legitim, bei Patienten mit Blackfan Diamond einen Versuch mit ATG Therapie durch-

zuföhren, da diese Therapie keine Gefahren für den Patienten in sich birgt. Bei den in der vorgelegten Arbeit untersuchten zwei Fällen von Blackfan Diamond Aplasie (M. N. und B. B.) kam es durch den Einsatz von ATG zwar vorübergehend zu einer Granulozyten- und Thrombozytendepression, aber ohne Schaden für die Patienten erholten sich die beiden Parameter innerhalb kurzer Zeit. Eine Beeinflussung der zugrunde liegenden Krankheit wurde jedoch nicht erreicht. Durch den Nachweis, daß bei einigen Fällen mit Blackfan Diamond'scher Anämie ebenfalls Suppressorimmunozyten die Differenzierung der Erythropoese verhindern sollen (34), ist aber möglicherweise bei Behandlung von mehr Patienten durchaus ein kurativer Effekt zu erwarten.

Eine ATG Therapie gleichzeitig mit einer Knochenmarkstransplantation wie sie von Speck vorgeschlagen wurde (42) ist nicht sinnvoller als eine ATG Therapie zusammen mit hochdosiertem 6-MP (siehe Seite 2). Eine Knochenmarkstransplantation zwei Monate nach ATG Therapie konnte bei B. M. den Tod nicht mehr verhindern. Die ATG Therapie nach einer erfolglosen Knochenmarkstransplantation erscheint dagegen als ultima ratio sinnvoller zu sein.

Bei den konventionellen Therapiemaßnahmen sind die Corticosteroide zu nennen, die einen fraglichen Einfluß auf das Krankheitsbild haben (Übersicht bei 16). Der Einfluß auf das Krankheitsbild könnte in einer schwach immunsuppressiven Funktion liegen, daneben wird ein günstiger Einfluß auf die thrombozytopenisch bedingte Purpura beschrieben. Andere immunsuppressive Verfahren wie der Einsatz von Cyclophosphamid haben z. T. die Ergebnisse der ATG Behandlung bestätigt. Basierend auf die Tatsache, daß Cyclophosphamid zur Konditionierung einer Knochenmarkstransplantation bei aplastischer Anämie gegeben wird und daß in einigen Fällen obwohl das Knochenmark nicht anwuchs kurative Effekte gesehen wurden, wurde auch Cyclophosphamid ohne Knochenmark-

transplantation gegeben. Bei dieser Endoxangabe konnten drei partielle Remissionen bei sieben Patienten gesichert werden. Bei vier Patienten, deren Knochenmark nicht anwuchs, erfolgten eine Vollremission und zwei Partiellemissionen (40).

Ebenso wurde neben der hochdosierten Endoxantherapie aufgrund der Berichte über günstigere Erfolge durch ATG auch eine extrem hochdosierte Corticosteroidtherapie als Immunsuppressivum eingesetzt (40,14). Diese letztere Methode hat sich wegen des zweifelhaften Effektes jedoch nicht durchsetzen können. Andere Versuche einer immunsuppressiven Therapie wie Gabe von Azathioprin oder 6-Mercaptopurin haben bisher keinen überzeugenden Beweis ihrer Wirksamkeit erbracht.

Zur Frage der Therapiewirksamkeit und Toxizität des ATG am Patienten:

In allen untersuchten Fällen bei denen wegen schwerer aplastischer Anämie ATG eingesetzt wurde, waren die Blutbildveränderungen reversibel. Bei drei Patienten trat der Tod im Verlauf der Krankheitsgeschichte ein, wobei keinerlei Bezug zur jeweiligen Ursache der aplastischen Anämie (in allen drei Fällen handelt es sich um erworbene aplastische Anämie verschiedener Genese) und zur Länge der Anamnese gegeben war. Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der ATG Gabe und dem eingetretenen Exitus war in keinem Fall konstruierbar. Bei unseren Fällen ist auch keine Beziehung zur gegebenen Dosis von ATG und dem jeweiligen Therapieeffekt erkennbar. Die heute empfohlenen Richtdosen für ATG, das vom Kaninchen gewonnen wird, liegen bei 15 mg/kg/Tag. Dabei wird täglich über 6 Stunden über 5 Tage das ATG über eine intravenöse Infusion appliziert. Die unterschiedlichen Dosen in der vorgelegten Arbeit erklären sich daher, daß einige der Patienten

zu einem Zeitpunkt mit ATG behandelt wurden, in dem diese Therapie sich noch in einem Experimentalstadium befand und man die Nebenwirkungen auf die hämopoetischen Stammzellen besonders fürchtete.

Wollte man eine zusammenfassende Beurteilung versuchen, dann ergibt sich aus den therapeutischen Erfahrungen, daß das Krankheitsbild der schweren aplastischen Anämie durch verschiedene Pathomechanismen bedingt sein kann, von denen sicherlich die Autoimmunmechanismen eine große Rolle spielen. Die Wahl der Therapie wird sich nach den im oben geschilderten Indikationsschlüsseln richten. Der probatorische Einsatz von ATG bei jüngeren Patienten, bei Patienten die eine lange Anamnese haben, bei Patienten für die kein HLA-identisches Geschwisterkind zur Verfügung steht, wird dem Therapeuten jedoch erleichtert durch die Tatsache, daß verhältnismäßig geringgradige Nebenwirkungen des ATG in Kauf genommen werden müssen. Die vorgelegte Arbeit sollte in erster Linie ein Beitrag zu dieser Frage nämlich zu einer möglichen Toxizität der ATG Anwendung beitragen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung einer schweren aplastischen Anämie im Kindesalter ist nach wie vor strittig, da die pathophysiologischen Zusammenhänge weitgehend unerforscht sind. Hauptthesen zum Pathomechanismus der aplastischen Anämie sind:

1. ein Stammzelldefekt,
2. eine autoimmunologische Erkrankung des Knochenmarkes. Experimentelle und klinische Untersuchungen geben Hinweise darauf, daß eine Therapie mit Anti-Thymozytenglobulin im Sinne einer immunsuppressiven Therapie im Sinne einer Beeinflussung der Suppressorimmunozyten eine günstige Wirkung auf den Verlauf einer aplastischen Anämie haben kann.

Präparationen von Anti-Thymozytenglobulin haben in der Regel die unangenehme Nebenwirkung, daß auch toxische Wirkungen auf hämopoetische Stammzellen auftreten können. Durch diese Tatsache wird der Einsatz von ATG-Präparationen in der Klinik problematisch, da Patienten mit schwerer aplastischer Anämie, die ohnedies nur eine geringe Resthämoopoese besitzen, bei der Anwendung von ATG unter Umständen schwere Nachteile in Kauf nehmen müßten.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es nun, an 15 kommerziellen vorhandenen ATG-Präparationen festzustellen, ob diese für den klinischen Einsatz prinzipiell geeignet sind. Als Maß einer unerwünschten hämopoetischen Toxizität insbesondere auf hämopoetische Stammzellen wurden die Seren in vitro mit der sogenannten Colony forming unit Methode getestet. Bei dieser Methode handelt es sich um einen Stammzellassay, mittels dessen es möglich ist, die Anzahl myeloopoetisch determinierter Stammzellen in einer definierten Menge einer Knochenmarkaspiration festzustellen.

Die Methode beruht prinzipiell auf einer Kultur in halbflüssigem Agarmedium.

Bei der Austestung der 15 Anti-Thymozytenglobuline konnte bei 14 Präparationen eine starke Hemmwirkung auf das Wachstum myelopoetisch determinierter Stammzellen festgestellt werden und zwar bei Verdünnungen bis zu 1 : 8000. Lediglich die Präparation RTC 2 hemmte erst bei einer Konzentration von 1 : 128. Aufgrund vergleichbarer Berichte in der Literatur und Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe konnte festgestellt werden, daß die Präparation RTC 2 zum gegenwärtigen Zeitpunkt für eine mögliche immunsuppressive Therapie einer schweren aplastischen Anämie geeignet ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde retrospektiv an 10 Patienten die klinische Toxizität von eingesetztem ATG überprüft. Das seinerzeit angewandte ATG hatte eine vergleichbare Stammzelltoxizität wie RTC 2, da es nur bis zu einer Verdünnung von 1 : 200 Stammzell-toxische Eigenschaften aufwies. Von den überprüften 10 Patienten hatten 2 Patienten eine sogenannte Blackfan Diamond'sche aplastische Anämie. Die anderen acht Patienten waren erworbene Anämien vom schweren Typ.

Die Überprüfung der peripheren Blutbildwerte der Patienten ergab, daß in allen Fällen eine spezifische Wirkung auf T-Lymphozyten, kenntlich am Abfall der Lymphozyten des peripheren Blutbildes, vorhanden war und daß in allen Fällen reversible Suppressionen der Resthämopoese, kenntlich am Abfall der Granulozyten, der Retikulozyten und Thrombozyten, eintraten.

Bei der weiteren Überprüfung der Krankengeschichten ergaben sich in drei Fällen kurative Verläufe nach ATG. In allen drei Fällen handelte es sich um erworbene aplastische

Anämien vom schweren Typ. In sieben anderen Fällen, darunter die zwei Fälle von Blackfan Diamond'scher Anämie, war keine Beeinflussung des Krankheitsbildes erkennbar. Irreversible Schädigung der Resthämopoese wurde in keinem Fall beobachtet. Drei Fälle verstarben Monate nach ATG Gabe im Rahmen ihrer Erkrankung. Ein zeitlicher Zusammenhang mit der ATG Gabe war nicht gegeben.

Im dritten Teil der Arbeit wurde aufgrund von in vitro Testen überprüft, ob es möglich ist, für den Einsatz einer ATG Behandlung bestimmte Fälle von schwerer aplastischer Anämie aus dem gesamten Kollektiv auszusondern. Eingesetzt wurden: Überprüfung des Colony stimulation factors, Überprüfung der sogenannten Knochenmark-Cokultur und die Feststellung der Anzahl von E-Rosetten-bildenden T-Lymphozyten im Knochenmark und peripheren Blut der Patienten. Daneben wurde auch die Anzahl von B-Lymphozyten, die Rosetten bilden, festgestellt. Bei diesen Untersuchungen ergab sich bisher kein Hinweis dafür, daß der Effekt einer ATG Behandlung korreliert ist mit der Anzahl von T-Lymphozyten im Knochenmark, der Höhe des Colony stimulation factors im Serum, oder der Hemmung oder Nichthemmung eines normalen Knochenmarkes durch das Knochenmark des Patienten (Cokultur).

Aufgrund der Untersuchungen und dem Vergleich mit relevanter Literatur wird versucht, die Voraussetzungen und notwendigen Tests für den ATG Einsatz besser einzugrenzen und zweitens eine Indikationsschlüssel für die Therapie von aplastischen Anämien vom schweren Typ zu erstellen. Dabei wird vor allen Dingen auf die konkurrierende Therapie der Knochenmarktransplantation Rücksicht genommen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Appelbaum F. R., Feter A.,
The Pathogeneses of AA
in: Seminars of Hematology 18, 4, 1981
2. Bacigalupo A., Podesta M., Von Lint M. T., Vimercati R.,
Cerri R., Rossi E., Risso M., Marmont A. M.,
Severe aplastic anemia: Correlation of in vitro tests
with clinical response to immunosuppression in 20 patients.
in: Brit. J. Haematol. 47, 423 - 433, 1981
3. Barnes D. W. H., Loutit J. F.,
Haemopoietic stemcells in the peripheral blood.
in: Lancet 2, 1138 - 1141, 1967
4. Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E.
Cytological demonstration of the clonal nature of
spleen colonies derived from transplanted mouse marrow
cells.
in: Nature 197, 452 - 455, 1963
5. Böttiger L. E.
Epidemiology and aetiology of aplastic anemia
in: Aplastic anemia (Eds.: Heimpel, Gordon-Smith,
Heit, Kubanek), Springer Verlag Berlin, Heidelberg,
New York, 27 - 37, 1979
6. Bradley T. R., Metcalf D.,
The growth of mouse bone marrow cells in vitro
in: Anst. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44, 287 - 300, 1966
7. Camitta B. M., Storb R., Thomas E. D.,
AA: Pathogenesis, Diagnosis, Treatment, and Prognosis
in: Journal of Medicine, 306, 11, 645 - 652, 1982

8. Camitta B. M., Thomas E. D.
SAA: A prospective study on the effects of androgens
or transplantation on hematology recovery and survival
in: Clinics Haemat. 7, 587 - 590, 1978
9. Champlin R., Winston Ho., Gale R. P.
ATG Treatment in patients with AA
in: Journal of Medicine, 308, 3, 113 - 118, 1983
10. Devergie A., Gluckman E., Faille A., Boiron M.,
Bernard J.
ATG Treatment in SAA. Long term follow up of
13 responder patients
in: Session on AA, Blut 41, 168 - 171, 1980
11. Gale P. R., Champlin R. E., Feig S. A., Fitchen J. H.
AA: Biologie and Treatment
in: Annals of Internal Medicine, 95, 477 - 494, 1981
12. Gluckman E.
Report of the European Bone Marrow Transplatation
- Aplastic Anemia Working Party
in: Exp. Hematol. 11, 13, 45 - 47, 1983
13. Gluckman E., Devergie A., Faille A.,
Treatment of severe aplastic anemia with antilymphocyte
globulin
in: Exper. Hematol. 5 (Suppl 2), 104 - 109, 1979
14. Gluckman E., Devergie A., Poros A., Degoulet P.,
Results of immunospression in 170 cases of severe
aplastic anaemia
in: Brit. J. Haematol. 51, 541 - 550, 1982

15. Heimpel H.
Die Panmyelopathien
in: Das Knochenmark (Ed. Queißer)
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 236 - 252, 1978
16. Heimpel H.
Stimulation of hemopoieses in aplastic anemia by
hormones and other agents
in: Aplastic Anemia (Eds.: Heimpel, Gordon-Smith,
Heit, Kubanek) Springer Verlag Berlin, Heidelberg,
New York, 129 - 138, 1979
17. Johndal M., Holm G., Wigzell H.
Surface markers on human T and B lymphocytes
in: J. exp. Med. 136, 207, 1972
18. Kaplan M. E., Clark C.
An improved rosetting assay for detection of human
T lymphocytes
in: J. Immunol. Meth. 5, 131, 1974
19. Kiessling R., Hochman P., Haller S., Shearer G. M.,
Wigzell H., Cudkowicz G.
Evidence for a similar common mechanism for natural
killer cell activity and resistance to hemopoietic
grafts
in: Eur. J. Immunol. 7, 655 - 663, 1977
20. Lake P., Mitchison N. A.
Regulatory mechanisms in the immune response to
cell surface antigens
in: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 589 - 594
1977

21. Lewis S. M., Dacie J. V.
The aplastic anemia paroxysmal nocturnal haemoglobinuria
syndrome
in: Brit. J. Hemat. 13, 236 - 241, 1967
22. Lynch R. E., Williams D. M., Reading J. C.,
Cartwright G. E.
The prognosis in AA
in: Blood 45, 517 - 528, 1975
23. Mathé G., Amiel J. L., Schwarzenberg L., Chouy J.,
Trolard P., Schneider M., Hayat M., Schlumberger J. R.,
Jasmin Cl.
in: Br. med. J. 131, 1970
24. McCulloch E. A., Till J. E.
The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow
to gamma radiation in vitro and in vivo
in: Radiat. Res. 16, 822, 1962
25. Metcalf D., Moore M. A. S.
Haemopoietic stem cells and progenitor cells
in: Haemopoietic Cells 70, 1971, North Holland
Publishing Company Amsterdam, London
26. Modan B., Segal S., Shani M., Sheba C.
Aplastic anemia in Israel: Evaluation of the aetiological
role of chloramphenicol on a community-wide basis
in: Amer. J. Med. Sci. 270, 441 - 445, 1975
27. Moore M. A. S.
Interpretations of culture data in aplastic anemia
Evidence of a suppressor cell involvement
in: Aplastic Anemia (Eds.: Heimpel, Gordon-Smith, Heit,
Kubaneck) Springer Verlag Berlin, Heidelberg,
New York, 265 - 272, 1979

28. Morley A., Blake J.
An animal model of chronic aplastic marrow failure
I. Late marrow failure after busulfan
in: Blood 44, 49 - 53, 1974
29. Najean Y., Girot R., Baumelou E.
For the joint group for the study of aplastic and
refractory anemia
Prognostic factors and evolution of aquired aplastic
anemia in childhood
in: Brit. J. Haemat. 4, 1981
30. Nakayama K. Nakagawa T.
Prevalence and clinical states of aplastic anemia
among children in Japan in: Aplastic Anemia
Proceedings of the first intern. sympos. on aplastic
anemia Kyoto 1976. Japan medical research foundation
Tokyo: University of Tokyo, 207 - 223, 1978
31. Netzel B., Haas R. J., Helmig M., Rodt H., Thiel E.,
Belohradsky B., Thierfelder S., Kleihauer E.

AA: The evidence of immuno- pathomechanismus and
succesfull treatment with absorbed AIG
in: Aplastic-Anemia (Eds.: Heimpel H., Gordon-Smith
E. C., Heit W., Kubanek B.) Springer Verlag Berlin,
Heidelberg, New York, 24, 181 - 191, 1979
32. Netzel B., Rodt H., et. al.
Transplantation of syngenic bone marrow incubated
with leukocyte antibodies. II. Cytotoxic activity
of anti-cALC globulin on leukemic cells and normal
precursor cells in man
in: Transplantation 26, 157, 1978

33. Netzel B., Rodt H., Hoffmann-Fezer G., Thiel E., Thierfelder S.
The effect of crude and differently absorbed ATG on granulocytic and erythropoietic colony formation
in: Exp. Hemat. 6, 410, 1978
34. O'Gorman Hughes D. W.
Aplastic anemia in childhood:
III. Constitutional aplastic anemia and related cytopenias
in: Med. J. Aust. 519 - 526, 1974
35. Oski F., Naiman J. L.
Hematologic problems in the newborn. W. B. Saunders, Philadelphia, 35 - 43, 294 - 296, 300 - 301, 1972
36. Pike B. L., Robinson W. A.
Human bone marrow colony growth in agar-gel
in: J. Cell Physiol. 76, 77, 1970
37. Pluznik D. H., Sachs L.
The cloning of normal "mast" cells in tissue culture
in: J. Cell, Comp. Physiol. 66, 319, 1965
38. Rothmann S. A., Streether R. R., Bukowski R. M., & Hewlett J. S.
Treatment of SAA with ATG
in: Exp. Hematol. 10, 9, 809 - 816, 1982
39. Schwarzenberg L., Mathé G.
in: A.L.G. Therapy and Standardization Workshop
(edited by F. E. Seiler and H. G. Schwick)
163, 1972

40. Silver B. J., Zuchermann K. S.
Aplastic anemia: Recent advances in pathogenesis and treatment
in: Med. Clin. North America 64, 4, 607 - 629, 1980
41. Singer J. W.
Co-culture studies in transfused and untransfused patients with aplastic anemia
in: Aplastic Anemia (Eds.: Heimpel, Gordon-Smith, Heit, Kubanek) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 273 - 276, 1979
42. Speck B., Gluckman E., Haak H. L., von Rood J. J.,
Treatment on AA by ALG with and without allogenic bone marrow infusions
in: Lancet 3, 1146, 1977
43. Thiel E.
B-cell lymphoma lacking Fc and C3d-receptors
in: Blut 37, 307, 1978
44. Thiel E., Rodt H., Huhn C., Netzel B., Grosse-Wilde H., Ganeshagurn K., Thierfelder S.
Multimarker classification of acute lymphoblastic leukemia: Evidence for further T subgroups and evaluation of their clinical significance
in: Blood 56, 759, 1980
45. Thomas E. D., Phillips J. H., Finch C. A.
Recovery from marrow failure following isogenic marrow infusion
in: J. Am. Med. Assoc. 188, 1041 - 1043, 1964

46. Till J. E., Mc Culloch E. A.,
A direct measurement of the radiation sensitivity
of normal mouse bone marrow cells
in: Radiat. Res. 14, 213, 1961
47. Whang K. S.
Aplastic anemia in Korea: A clinical study of
309 cases
in: Aplastic Anemia
Proceedings of the first intern. sympos. on aplastic
anemia. Kyoto 1976 Medical Research Foundation
Tokyo: University of Tokyo Press, 225 - 240, 1978
48. Wu A. M., Till J. E., Siminovitch L., et al,
A cytological study of the capacity for differen-
tiation of normal hemopoietic colony-forming-cells
in: J. Cell. Physiol. 69, 177, 1967

L E B E N S L A U F

Name: Winfried, Richard Huber

Geburtsdatum: 27. April 1960

Geburtsort: München

Eltern: Dr. jur. Otmar Huber, Landrat
Billhilde Huber, geb. Happ

Schulbildung: Grundschule 1967 - 1971 in Bad Tölz
Gymnasium 1971 - 1979 in Bad Tölz
Abitur 1979 am Math.-Naturwissen-
schaftl. Gymnasium Bad Tölz

Wehrdienst: 1979 - 1980 Fla Rak Kanonier beim
Luftwaffenbataillon 33 in Lenggries

Studium: 1980 Beginn an der Ludwig-Maximilian-
Universität in München

1982 1. Vorärztliche Prüfung (Physikum)

1982 Beginn meiner Doktorarbeit im
hämatologisch-onkologischen Forschungs-
labor der Kinderklinik der Universität
München

1983 1. Ärztliche Prüfung

